

WAGNER APARECIDO FRANÇA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E FUNCIONAL DA
AMPLIAÇÃO VESICAL COM “SCAFFOLD” BIOLÓGICO E
SINTÉTICO COM E SEM SEMEADURA DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO
ADIPOSO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS.**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

São Paulo

2019

WAGNER APARECIDO FRANÇA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E FUNCIONAL DA
AMPLIAÇÃO VESICAL COM “SCAFFOLD” BIOLÓGICO E
SINTÉTICO COM E SEM SEMEADURA DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO
ADIPOSO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS.**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Orientador:

Prof. Dr. Fernando Gonçalves de Almeida

São Paulo

2019

França, Wagner Aparecido

Avaliação histológica e funcional da ampliação vesical com “scaffold” biológico e sintético com e sem semeadura de células tronco mesenquimais derivadas de gordura. Estudo experimental em coelhos / Wagner Aparecido França - São Paulo, 2019.

xvii, 66p

Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Urologia.

Título em inglês: Urinary metabolomic analysis of women with interstitial cystitis.

1. Cistite Intersticial.
2. Síndrome da Bexiga Dolorosa.
3. Metabólitos-alvo.
4. Urina.
5. Metabolismo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. José Carlos Costa Baptista Silva

Coordenador do curso de pós-graduação:

Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

Dedicatória

Dedico esta jornada que percorri, este momento especial e singular, à minha esposa Karen, minha filha Rebeca, meu filho Leonardo, aos meus pais Benedito e Cleide, à minha avó Jandira, meus irmãos e amigos.

Obrigada por todo o apoio e compreensão!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir me realizar este sonho.

Ao Prof. Dr. Fernando Gonçalves de Almeida, pela oportunidade, disponibilidade e orientação, um exemplo de grande professor e pessoa.

Ao Dr. Luis Augusto Seabra Rios pela oportunidade, lealdade e bons exemplos que norteiam minha trajetória médica, científica e pessoal.

Ao Dr. Milton Skaff, pela recepção amistosa e fraterna na Unifesp, confiança e respeito, a sua simplicidade associada a competência me inspira.

Ao Dr. Eduardo Remaile, grande amigo que me orientou em diversos momentos.

Aos alunos, agora médicos Luiz Eduardo Bento De Rizzo e Louisie Tavares vocês foram protagonistas na composição desta tese.

Ao Dr. Edson Gurfinkel pela generosidade e respeito.

Ao Professor Dr. Ricardo Bertolla pela compreensão.

Aos meus amigos, Dr. Leonardo Nogueira, Dr. Paulo Mazzili, Dr. Davidson Bezerra da Silva, Dra. Alessa Cunha Machado, Dra. Denise Sbrissiae Silva Gouveia e Dr. Alex da Silva grandes médicos e companheiros desta árdua caminhada.

Ao amigo e grande companheiro Dr. Luciano Teixeira e Silva.

Ao amigo Alexandre Dianni, companheiro de muitas tardes no laboratório, divido essa congratulação com você.

À grande enfermeira Márcia Eli Girotti exemplo de competência, pesquisadora e simpatia.

À Letícia de Sá Barretto pela paciência e competência na ajuda da composição deste trabalho e Camila pela ajuda direta e indireta na pesquisa.

À Professora de estatística Gianni pela singular assessoria estatística e paciência.

À Dra. Kátia Leite pela disponibilidade, gentileza e colaboração durante este estudo.

Ao Dr Joseph Philipi Vacanti pela doação dos scaffolds.

À toda a equipe do Laboratório de Patologia Genoa pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Evaldo Soares Cabral Junior pela ajuda extraordinária na manipulação dos animais.

A Dra. Elisa Allegro Baptista pela oportunidade de executar a minha prática em animais.

À Cristina de Oliveira e Silva, auxiliares e técnicas do ambulatório do distúrbio miccional da Unifesp, pela ajuda com a esterilização e composição da “mala dos coelhos”.

À minha família, especialmente aos meus amores Karen e Rebeca, a primeira pelo companheirismo desde meus 15 anos, a menina que pagou a minha primeira inscrição de vestibular, e a última por florescer minha vida, a flor que trouxe a felicidade plena.

Ao meu filho Leonardo, pequeno guerreiro que me fez mais forte.

À minha avó Jandira, um exemplo materno e a fonte de meus princípios.

Aos meus primos Roberto Antunes Soares Junior e Renato Antunes Soares pelo apoio em diversos momentos.

À minha tia Eunice pelo apoio na minha infância.

À tia Angela, tio José Carlos da Mata e Sergio Luiz Esteves pela aposta e respeito desde minha infância.

À Tania Mara da Mata pela generosidade e respeito, uma grande irmã.

Aos meus irmãos João Victor e Luiz Gustavo, espero que minha jornada sirva de inspiração à vida de vocês.

A minha mãe Cleide pelo suporte incondicional e esforço pessoal no meu desenvolvimento.

Ao meu pai, Benedito, exemplo grande Homem, caráter e profissional.

Aos grandes assistentes da urologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas os quais me ensinaram a arte urológica, em especial Guilherme Becker, André Meirelles, Edson Schneider, Lísias Nogueira Castilho, Alexandre Grieco e Fabiano Simões.

Aos meus amigos de residência, Luiz Guilherme Barbasisi, Guilherme Bunchen, Leonardo Chiesse, Dr. Flavio Paulatti e Lucas Zepponi, pelo companheirismo.

Agradeço ao ensino e formação cívica das instituições Centro Educacional Sesi 183, colégio Henriqueta Vialta Saad, Universidade Severino Sombra, Hospital Ermelino Matarazzo e Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

Aos meus amigos da Universidade Severino Sombra, em especial Davi Oscar Paulauskas, Lucas José Zamith Gadioli e Thiago Cassiano de Siqueira.

Aos meus amigos Luis Claudius Pereira Costa, Alexandre Jover Lázaro e Bruno Soeiro Ochiuto.

Ao Dr. Renato Panhoca pelo ajuda, companheirismo e respeito.

Ao Dr. Limírio Leal pela recepção amistosa no lamspe e pela confiança.

Aos amigos Dr. Armênio Soares, Dr. Delmo, Dr. José Rubens, Dr. Nilton Ledoux, Dr. Rodolfo, Dr. Marcos Vinícius pela oportunidade inicial e respeito no início da minha carreira.

Ao Dr. Paulo Feroldi grande médico, amigo e irmão.

Ao Dr. Nilton Taciro, grande urologista e professor.

À Dra Leda Telesi, minha grande professora de cirurgia.

Ao tio Odair e tia amigos e exemplos eternos.

Ao meu grande amigo Leonardo Chiesse e Bruno Soeiro, pela parceria em diversos momentos.

Agradeço ao Hospital do Servidor Público Estadual, residentes e colegas assistentes do serviço de urologia e centro de estudos urológicos, os quais me impulsionaram através do respeito, companheirismo, conselhos e momentos singulares.

Agradeço a toda estrutura hospitalar das diversas instituições as quais frequentei, secretários, faxineiros, vigias, auxiliares de enfermagem, fisioterapeutas, enfermeiros e médicos.

À Disciplina de Urologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

À Secretaria da Disciplina de Urologia.

À FAP-UNIFESP (Fundação de apoio à Universidade Federal de São Paulo).

SUMÁRIO

Agradecimentos	v
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	8
3 MÉTODOS	10
3.1 Coleta de tecido adiposo para célula tronco	12
3.2 Isolamento e cultura de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo	13
3.3 Caracterização de marcadores celulares das células tronco mesenquimais	14
3.4 Obtenção e preparo dos “scaffolds” de matriz extracelular	14
3.4.1 Protocolo de descélularização do “scaffold” de matriz extracelular	15
3.5 Implante do “scaffold” na submucosa vesical	16
3.6 Cistectomia	18
3.7 Avaliação Histológica	19
3.7.1 Hematoxilina & Eosina	19
3.7.2 Tricrômio de Masson	21
3.8 Avaliação funcional	22
3.9 Análise estatística-descritiva	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Análise de polimorfonucleares (PMN)	26
4.2 Análise de linfócitos	27
4.3 Análise de macrófagos	29
4.4 Análise de célula gigante de corpo estranho (CGCC)	31
4.5 Análise da capacidade cistométrica máxima (CGM)	32
4.6 Análise da complacência vesical (CV)	32
4.7 Avaliação quantitativa de colágeno	40
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	46
7 ANEXOS	48
7 REFERÊNCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema da imunidade humoral	6
Figura 2.	Esquema da imunidade celular	6
Figura 3.	Delineamento experimental.....	12
Figura 4.	Incisão para coleta de gordura da região inguinal	13
Figura 5.	Bexiga de coelho pré (A) e pós (B) processo de descelularização	16
Figura 6.	Técnica cirúrgica. 1) Exposição da bexiga; 2) Dissecção da área para implantação de “scaffold”; 3) Miotomia do detrusor; 4) Preparo para implante de “scaffold”; 5) Bexiga ampliada com “scaffold” de matriz extracelular e 6) Bexiga exposta para cistectomia	17
Figura 7.	Implante de “scaffold” de PGA	18
Figura 8.	Lâmina de hematoxilina e eosina de coelho implantado PGA, seta preta path de gordura, seta azul o músculo detrusor e seta verde o “scaffold” de matriz (200x)	19
Figura 9.	Lâmina de hematoxilina e eosina contagem celular, seta preta área de “scaffold” de PGA, seta amarela área com destaque nos tipos celulares e a seta azul, Linfócitos. (400x)	20
Figura 10.	Campo contado com o programa <i>ImageJ</i> e auxílio do plug-in <i>Cell Counter</i> . “Type” 1 – polimorfonucleares; “Type” 2 – linfócitos; “Type” 3 – macrófagos; “Type” 4 - células gigantes de corpo estranho; “Type 5” - vasos sanguíneos	20
Figura 11.	Lâmina de Tricrômio de Masson com magnificação óptica de 200 vezes, abaixo do “software” <i>ImageJ</i> e lateral ao plug-in <i>Threshold Colour</i> . Seta preta, o scaffold de matriz, seta azul, o tecido adiposo e a seta amarela, o músculo detrusor	21
Figura 12.	Lâmina de Tricrômio de Masson, seta amarela representa o colágeno e a seta preta o músculo detrusor	22
Figura 13.	Coelho durante exame, com sonda uretral de duplo lúmen	23

Figura 14. Estudo urodinâmico em coelhos demonstrando no ponto 1, a Capacidade cistométrica máxima e no ponto 2, o VPdet40 cmH ₂ O	23
Figura 15. Variação da capacidade cistométrica máxima na quarta semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados	34
Figura 16. Variação da capacidade cistométrica máxima na oitava semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados	35
Figura 17. Variação da capacidade cistométrica máxima na décima segunda semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados	36
Figura 18. Variação do volume vesical na pressão detrusora de 40 na quarta semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados	37
Figura 19. Variação do volume vesical na pressão detrusora de 40 na oitava semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados	38
Figura 20. Variação do volume vesical na pressão detrusora de 40 na décima semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Avaliação da presença de polimorfonucleares na área de implante vesical, de acordo com tempo de intervenção e grupo estudado	26
Tabela 2.	Resultados das comparações múltiplas pelo método de Dunn entre os grupos para polimorfonucleares	27
Tabela 3.	Avaliação da presença de linfócitos na área de implante vesical, de acordo com tempo de intervenção e grupo estudado	28
Tabela 4.	Resultados das comparações múltiplas pelo método de Dunn entre os grupos para linfócitos	29
Tabela 5.	Avaliação da presença de macrófagos na área de implante vesical, de acordo com tempo de intervenção e grupo estudado	30
Tabela 6.	Resultados das comparações múltiplas pelo método de Dunn entre os grupos para macrófagos	30
Tabela 7.	Avaliação da presença de células gigantes de corpo estranho, na área de implante vesical, de acordo com tempo de intervenção e grupo estudado	31
Tabela 8.	Resultados das comparações múltiplas pelo método de Dunn entre os grupos para CGEE	32
Tabela 9.	Resultados das comparações múltiplas pelo método de Dunn entre os grupos para o aumento da capacidade cistométrica máxima (CCM) e volume vesical na pressão detrusora de 40 cmH ₂ O (VPdet40)	33
Tabela 10.	Avaliação da área do colágeno (%), na área de implante vesical, de acordo com tempo de intervenção e grupo estudado	40

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	49
Anexo 2.	Diagrama de dispersão unidimensional dos polimorfonucleares dos animais, segundo semana e grupo	50
Anexo 3.	Diagrama de dispersão unidimensional dos linfócitos dos animais, segundo semana e grupo	51
Anexo 4.	Diagrama de dispersão unidimensional dos macrófagos dos animais, segundo semana e grupo	52
Anexo 5.	Diagrama de dispersão unidimensional das células gigantes de corpo estranho dos animais, segundo semana e grupo	53
Anexo 6.	Resultados inferenciais (valores de p) do teste de Kruskal-Wallis na comparação histológica e funcional entre os grupos, independente da semana	54
Anexo 7.	Diagrama de dispersão unidimensional do aumento da capacidade cistométrica máxima (CCM) dos animais, segundo semana e grupo	55
Anexo 8.	Diagrama de dispersão unidimensional do aumento do volume vesical na pressão detrusora de 40 cmH ₂ O (VPdet40) dos animais, segundo semana e grupo	56
Anexo 9.	Medidas-resumo da capacidade cistométrica máxima (CCM) dos animais, segundo semana, grupo e momento de tempo	57
Anexo 10.	Medidas-resumo do VPdet40, dos animais, segundo semana, grupo e momento de tempo	58
Anexo 11.	Resultados inferenciais (valores de p) do teste de Wilcoxon na comparação entre os momentos pré e pós da CCM e do VPdet40, segundo grupo e semana	59
Anexo 12.	Diagrama de dispersão unidimensional área do colágeno (%) dos animais, segundo semana e grupo, sendo grupo 1 controle, grupo 2 scaffold de matriz, grupo 3 scaffold de matriz associado a célula tronco, grupo 4 PGA e grupo 5 PGA com célula tronco	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADSC:	Célula tronco derivado de tecido adiposo
BTX-A:	toxina botulínica A
CCM:	Capacidade cistométrica máxima
Ccm pré:	CCM Pré- intervenção
Ccm pós:	CCM Pós- intervenção
CCF:	capacidade cistométrica funcional
CV:	complacência vesical.
CGCE:	célula gigante de corpo estranho
CIL:	O cateterismo intermitente limpo
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Dnase:	desoxiribonuclease
DNTUI:	disfunção neurogênica do trato urinário inferior
MEC:	matriz extracelular (do inglês: extracellular matrix)
H&E:	hematoxilina-eosina
HLA:	antígeno leucocitário humano
HND:	hiperatividade neurogênica do detrusor
ICS:	Sociedade Internacional de Continência
ITU:	infecção urinária
PBS:	tampão fosfato (do inglês: phosphate buffered saline)
Pdet40:	pressão detrusora de 40 cm H ₂ O
Pdet pré:	Pressão detrusora pré intervenção
Pdet pós:	Pressão detrusora pós intervenção
PGA:	ácido poliglicólico
PLA:	ácido polilático
PMN:	polimorfonucleares
Rnase:	ribonuclease
RVU:	refluxo vesicoureteral
SDS:	dodecil sulfato de sódio (do inglês: sodium dodecyl sulfate)
SFB:	soro fetal bovino
SIS:	submucosa do intestino delgado suíno (do inglês: small intestine submucosa)
SMA:	α -actina de músculo liso (do inglês: smooth muscle actin)
TUS:	trato urinário superior
VPdet40:	volume em ml onde se atinge a pressão detrusora de 40 cmH ₂ O.

RESUMO

Objetivo: Avaliar os parâmetros histológicos e funcionais da ampliação vesical em coelhos com “scaffold” de matriz extracelular e de “scaffold” sintético de ácido poliglicólico, com e sem semeadura de célula tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo. **Métodos:** Estudo experimental com 5 grupos de nove coelhos, grupos controle, ampliação vesical com “scaffold” de matriz extracelular com semeadura de células tronco derivada de tecido adiposo, ampliação vesical com “scaffold” de matriz extracelular sem semeadura de células tronco, ampliação vesical com “scaffold” de ácido poliglicólico com semeadura de células tronco e por fim grupo de ampliação vesical com “scaffold” de ácido poliglicólico sem semeadura de células tronco. Foram avaliados na fase cistométrica, do estudo urodinâmico, a capacidade cistométrica máxima e o volume vesical onde é atingido a pressão detrusora de 40 cmH₂O. A análise histológica, realizada na quarta, oitava e décima segunda semana foi feita com a coloração hematoxilina e eosina (H&E), para verificar a reação inflamatória local, através da contagem dos polimorfonucleares, linfócitos, macrófagos e célula gigante de corpo estranho. A coloração de Tricômio de Masson foi utilizada para verificar a área de colágeno. A célula tronco utilizada foi derivada de tecido adiposo, coletada da região inguinal do coelho e cultivada no nosso laboratório. **Resultados:** Na análise de polimorfonucleares houve alterações significantes na oitava e décima segunda semana, ($p=0,032$) e ($p=0,033$), respectivamente, na avaliação dos linfócitos houve alterações significante na quarta, ($p=0,040$), oitava, ($p=0,025$) e décima segunda semana ($p=0,026$). Na análise de macrófagos houve alterações significantes na quarta semana, ($p=0,033$) e oitava semana, ($p=0,034$), na análise de célula gigante de corpo estranho, somente na décima segunda semana houve alteração significativa, ($p=0,015$). A análise de colágeno não demonstrou diferença estatística nos grupos estudados, as áreas de fibrose foram iguais ao grupo controle. Na análise funcional, o VPdet 40, pré cistoplastia e pós cistoplastia, entre os grupos, ocorreram aumentos significantes nos grupos “scaffold” de matriz extracelular e de PGA ambos semeados com célula tronco mesenquimal, demonstrando que a técnica permite a melhora da função vesical ($p=0,049$ e $p=0,013$, respectivamente). Não houve aumento significativo na capacidade cistométrica máxima, contudo verificou-se uma tendência de aumento no grupo PGA semeado com célula tronco. **Conclusões:** As técnicas de ampliação vesical com implante de “scaffolds” de matriz extracelular e PGA, semeados ou não semeados com célula tronco mesenquimal derivado de tecido adiposo, não geraram reação inflamatória deletéria, denominada rejeição e houve aumento da complacência vesical,

com a manutenção da capacidade cistométrica. O uso de célula tronco diminui reação inflamatória na bexiga ampliada com “scaffolds”.

PALAVRAS-CHAVE: Bexiga Neurogênica Neurológica, ampliação vesical e “scaffold”.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the histological and functional parameters of bladder enlargement in rabbits with the use of extracellular matrix scaffold and synthetic polyglycolic acid (PGA) scaffold, with and without fat-derived stem cell seeding. **Methods:** Experimental study which presents 5 groups of nine rabbits: control, extracellular matrix scaffold bladder enlargement with fat-derived stem cell seeding, extracellular matrix scaffold bladder enlargement without stem cell seeding, scaffold bladder enlargement with polyglycolic acid and stem cell seeding and finally group of scaffold bladder enlargement of polyglycolic acid without stem cell seeding. Bladder function was evaluated by analysis of maximal cystometric capacity and bladder capacity in detrusor pressure of 40 cmH₂O, by urodynamic study and histology, both on the fourth, eighth and twelfth week. Histological analysis was performed with hematoxylin and eosin (H&E) staining to verify the inflammatory reaction (rejection) with the counting of polymorphonuclear cells, lymphocytes, macrophages and foreign body giant cell. Masson's trichrome staining was used to verify the formation of fibrosis through the collagen area. The stem cell used was derived from fat collected from the inguinal region of the rabbit and grown in culture medium. **Results:** Significant changes in the eighth and twelfth week, ($p = 0.032$) and ($p = 0.033$), respectively, in polymorphonuclear cells, foreign body giant cells, macrophages and lymphocytes did not show a rejection-like inflammatory reaction that can occur in clinical transplantation, although they are increased. Collagen analysis showed no statistical difference in the studied groups, the fibrosis areas were equal to the control group. In the functional analysis of variance of pre-cystoplasty and post-cystoplasty bladder compliance, between groups, there were significant increases in the scaffold and PGA groups both seeded with mesenchymal stem cell, demonstrating that the technique allows the improvement of bladder capacity in detrusor pressure of 40 cmH₂O ($p = 0.049$ and $p = 0.013$, respectively). Cystometric capacity showed no significant increase but showed a tendency to increase in the PGA group seeded with stem cell. **Conclusions:** Bladder enlargement techniques with implantation of extracellular matrix and PGA scaffolds, seeded or not seeded with fat-derived mesenchymal stem cell, did not generate a deleterious inflammatory reaction, called rejection, and increased bladder capacity in detrusor pressure 40 cmH₂O. The use of stem cells decreases inflammatory reaction in the enlarged bladder with scaffolds.

KEY WORDS: Neurogenic bladder, bladder augmentation and scaffold.

1 INTRODUÇÃO

As disfunções vesicais decorrentes de doenças neurológicas afetam 400 milhões de pessoas em todo o mundo ⁽¹⁾. Calcula-se que 1 em cada 1000 recém-nascidos apresentam disrafismo espinhal com provável Disfunção Neurogênica do Trato Urinário Inferior (DNTUI) ⁽¹⁾. No Brasil, não existem dados consistentes sobre a prevalência desta disfunção, porém nos pacientes com lesões medulares a incidência de DNTUI é 71 casos por 1 milhão de habitantes, número quase o dobro do Japão e Estados Unidos. Os índices nos países subdesenvolvidos são mais elevados decorrentes de acidentes de trânsito e violência urbana e 80 % desses casos poderão ter algum grau de disfunção vesical ⁽²⁾.

A fisiopatologia básica do comprometimento do trato urinário superior deve-se ao aumento de pressão intravesical decorrente do déficit de complacência vesical, hiperatividade detrusora neurogênica ou aumento da resistência uretral ⁽³⁾. Sabemos que independente da doença, o parâmetro pressórico vesical estabelecido para possíveis danos renais é de 40 cm H₂O ^(1,4). As altas pressões de armazenamento e esvaziamento podem levar a infecções urinárias, incontinência urinária, danos estruturais no trato urinário superior e inferior, que por fim podem levar a insuficiência renal. A dissinergia detrusor esfinteriana, é a principal responsável pela elevada resistência uretral nos casos DNTUI. Neste cenário pode-se ter micções e perda urinária com elevada pressão vesical, decorrente do quadro de obstrução infravesical funcional ⁽⁴⁾.

A topografia das lesões neurológicas é muito importante para diagnóstico e evolução dos pacientes. Lesões do sistema nervoso central acima do centro sacral da micção, geralmente levam a bexiga hiperativa neurogênica (HND) ⁽⁵⁾. Se essas lesões estão abaixo do centro pontino da micção esperamos dissinergismo vésico- esfinteriano ⁽⁵⁾. As lesões no centro sacral podem levar tanto ao déficit de contralidade da musculatura detrusora quanto déficit na musculatura esfinteriana, a primeiro pode condicionar a retenção urinária e a segunda pode levar a incontinência urinária, por lesão direta da inervação esfinteriana ^(4,5,6).

A premissa dos tratamentos das DNTUI com risco para o trato urinário superior é a diminuição das pressões de armazenamento e esvaziamento vesical ⁽⁵⁾. As alternativas terapêuticas disponíveis para o tratamento das DNTUI são medidas

farmacológicas, cateterismo vesical intermitente (CIL), sondas vesicais de demora, injeção de toxina botulínica vesical ou esfínteriana e os procedimentos mais invasivos como as esfícterotomia e as enterocistoplastias ^(5,6,7,8).

Em 1898, o cirurgião Johann von Mikulicz-Radecki descreveu o uso de um segmento do íleo para ampliar a bexiga e assim iniciou-se o tratamento cirúrgico, com essa nova técnica. Desde então, inúmeras técnicas e variantes foram desenvolvidas. Para tanto, buscou-se no emprego de todos os tipos de segmentos do trato gastrointestinal — desde o estômago até o cólon sigmóide — um substituto ideal para a parede da bexiga ^(9,42).

Transcorridos mais de cem anos e na falta de um substituto ideal, o segmento gastrointestinal ainda permanece como a primeira escolha pela maioria dos cirurgiões quando se torna necessário ampliar a bexiga.

Nos casos de déficit de complacência vesical refratários a tratamento clínicos, a ampliação vesical é o tratamento de escolha ⁽⁵⁾. Esta pode ser realizada com segmentos do trato gastrointestinal (íleo, estômago ou cólon). Esta cirurgia é um procedimento de grande porte, como tal apresenta considerável risco de complicações no curto, médio e longo prazo ⁽⁵⁾. As complicações observadas em médio e longo prazos decorrem das diferenças estruturais e funcionais da parede intestinal e vesical ^(9,10).

Dentre potenciais problemas decorrente das enterocistoplastias, temos a produção crônica de muco a qual pode gerar retenção urinária aguda e a laceração vesical, bacteriúria persistente, infecções do trato urinário de repetição, alterações metabólicas, formação de cálculo urinário, déficits de vitaminas e as neoplasias vesicais ⁽¹⁰⁾.

Baseado na complexidade e morbidade da enterocistoplastia, a busca de alternativas teciduais aos segmentos intestinais tem sido constante e amplamente desejada pela comunidade científica internacional ⁽¹²⁾.

Os avanços tecnológicos na engenharia tecidual levaram ao desenvolvimento de biomateriais como os “scaffolds”. Estes são arcabouços onde

as células se entrelaçam se para a formação de novos tecidos com comportamento funcional e biológico adequados e semelhante ao tecido nativo, apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência e induzem a adequada regeneração ⁽¹¹⁾.

Estes biomateriais podem ser de 3 tipos, derivados de cerâmica, como hidróxido apatita, polímeros sintéticos, de PGA (ácido poliglicólico) ou PLA (ácido polilático) e os polímeros naturais, como derivados de colágenos, proteoglicanos, Chitosan, Alginato, além da matriz extracelular de bexiga e a submucosa de intestino delgado (SIS® – small intestine submucosa) ⁽¹³⁾.

Os “scaffolds” derivados de cerâmica são desenvolvidos e pesquisados na reparação óssea, os polímeros sintéticos são de fácil obtenção e disponibilidade, porém apresentam uma maior reação inflamatória, pois apresentam menor biocompatibilidade, comparando com “scaffolds” naturais ⁽¹⁴⁾.

A submucosa intestinal porcina (SIS), foi amplamente estudada, todavia os resultados a longo prazo do SIS não foram satisfatórios devido a reação imunológica cruzada e grande reação inflamatória deste enxerto, levando a fibrose ^(14,15,16). A avaliação histológica da cistoplastia com SIS demonstrou uma diminuição da capacidade cistométrica devido a uma inadequada formação de camada de detrusor madura e uma deposição, em excesso, de colágeno no local ^(14,15,16).

O uso do “scaffold” de matriz extracelular derivado de bexiga apresenta a biocompatibilidade como a vantagem principal, esta característica gera menor reação inflamatória e diminui a chance de fibrose do órgão transplantado. Os poros deste “scaffod” permitem o entrelaçamento de células do tecido nativo, como o detrusor. Esta técnica poderá ser desenvolvida como transplante vesical com doadores cadáveres, usando tiras de “scaffold” para ampliar a bexiga ^(13,14).

O uso do “scaffold” sintético de PGA é factível, apresenta mínima reação inflamatória e ou rejeição, além da fácil disponibilidade do material, características que estimulam a utilização ^(14,15).

Os “scaffolds” biológicos ou sintéticos, podem ser semeados ou não, com células tronco derivado de tecido adiposo (ADSCs) ^(5,14). As células-tronco derivadas de tecido adiposo podem ser autólogas ou heterólogas, sendo que aquelas possuem característica imunomoduladora maior, diminuem a reação inflamatória e por último regeneram o tecido nativo, reparando defeitos vesicais e isto nos estimulou a utilizar um modelo animal para este experimento ⁽¹⁷⁾.

O “scaffold” implantado se comporta como um enxerto do transplante clínico, como tal, pode apresentar reações inflamatórias de defesa, tipo agudas e crônicas, rejeições hiperaguda, aguda e crônica, mediada pela imunidade humoral e celular ⁽¹⁸⁾, como esquematizado na figura 2 e 3. As reações agudas e crônicas são arbitrárias, pois sabemos que as células efetoras de tal processo, como os polimorfonucleares, células gigantes de corpo estranho, macrófagos, monócitos e linfócitos aparecem ao mesmo tempo com atividades ímpares e congruentes ⁽¹⁹⁾.

A reação inflamatória aguda (imunidade humoral) tem a duração de dias e é iniciada quando o antígeno é exposto ao hospedeiro, condicionando uma vasoconstrição local seguida de uma vasodilatação, levando ao fluxo sanguíneo mais lento, permitindo a marginalização e a transmigração dos neutrófilos para a fagocitose do complexo antígeno- anticorpo, no caso o “scaffold” ⁽¹⁹⁾.

A reação inflamatória crônica (imunidade celular) é iniciada com a fagocitose do antígeno pelos macrófagos, seguida da exposição do complexo antígeno anticorpo para os linfócitos os quais se diferenciam em células de memória, helper e natural killer ⁽²⁰⁾. O primeiro permitirá o reconhecimento e a imunidade em possíveis exposições ao mesmo antígeno, o segundo é capaz de produzir anticorpos para imunidade humoral e o último é o responsável principal no combate ao agressor (antígeno). As figuras 1 e 2 demonstram a imunidade desencadeada nas duas vias, diante da invasão de um antígeno, que pode ser um órgão ou tecido transplantado, como o “scaffold” ^(19,20,21).

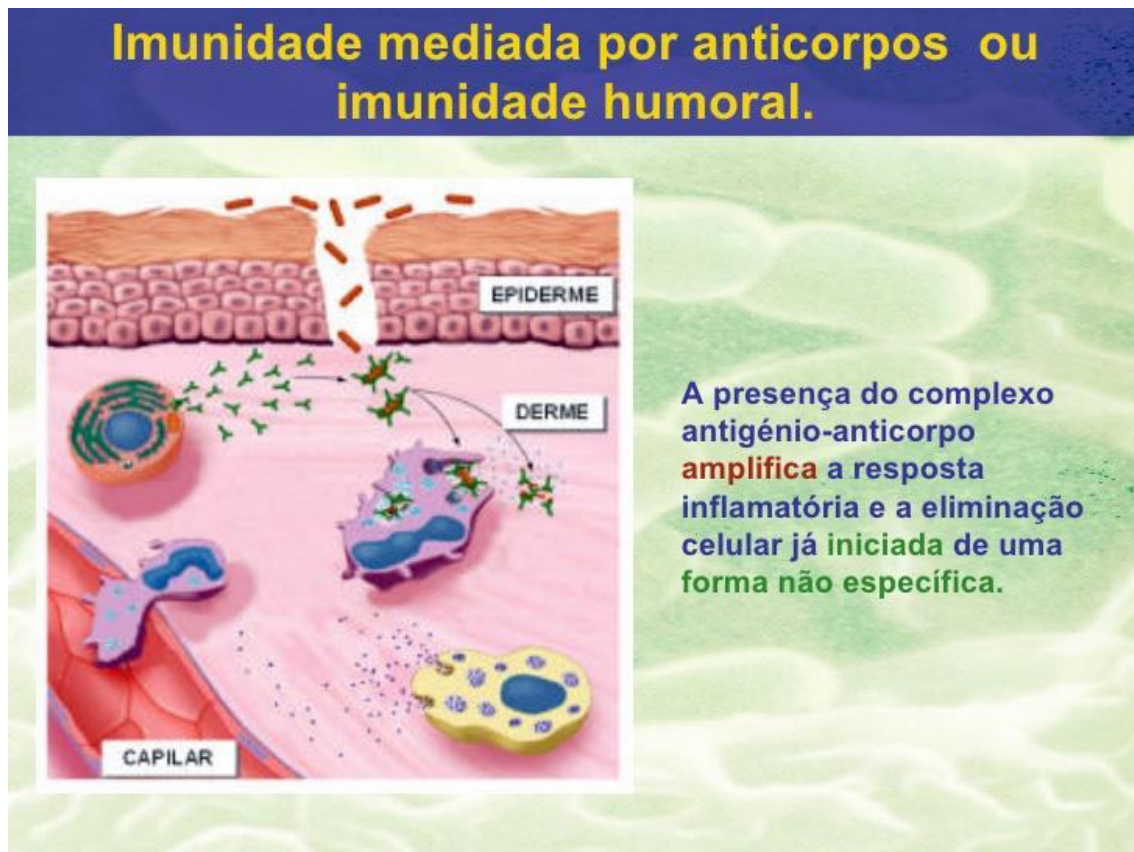


Figura 1. Esquema da imunidade humoral. Fonte: Voltarelli *et al.*, 2008

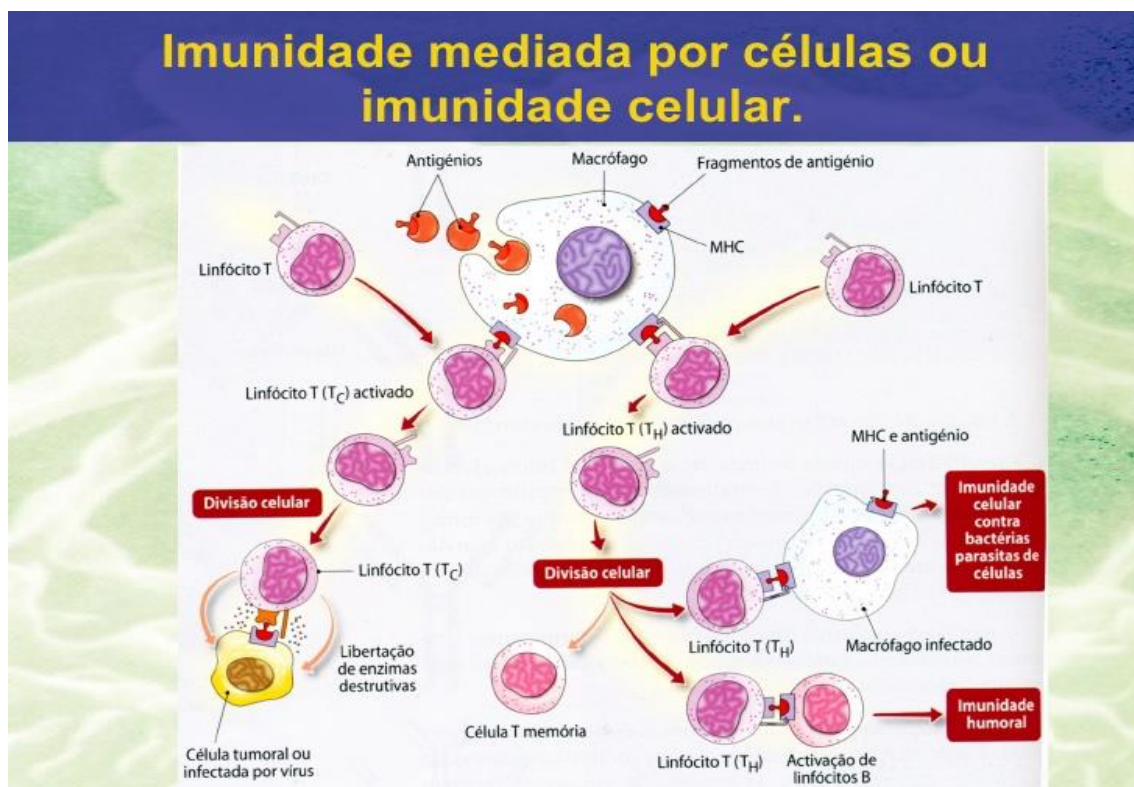


Figura 2. Esquema da imunidade celular. Fonte: Voltarelli *et al.*, 2008

Tendo em vista a importância do avanço de técnicas menos invasivas para o tratamento dos pacientes com DNTUI, o desenvolvimento dos “scaffolds”, o isolamento e o cultivo de células-tronco derivadas de tecido adiposo para ampliação vesical são importantes. Essa investigação visou avaliar a viabilidade de utilização de “scaffolds” biológicos e sintéticos, semeados ou não com células tronco para reconstrução vesical.

2 OBJETIVO

Avaliar resultados funcionais e histológicos da ampliação vesical em coelhos com “scaffold” de matriz extracelular e de ácido poliglicólico, semeados ou não com células-tronco autólogas mesenquimais derivadas de tecido adiposo.

3 MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Centro de Pesquisa em Urologia da UNIFESP e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina (Anexo 1). Os animais foram fornecidos pelo CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da UNIFESP).

O estudo foi feito com 54 coelhos adultos machos, da raça Nova Zelândia, peso entre 2 e 3 kg. Estes foram distribuídos em cinco grupos de nove coelhos os quais foram subdivididos em 3 coelhos avaliados na quarta semana, 3 coelhos avaliados na oitava semana e 3 coelhos avaliados na décima segunda semana, além de 9 coelhos doadores de bexiga para confecção de scaffold de matriz, como demonstrado na figura 3.

Delineamento experimental:

- a) Grupo 1:** Controle, onde realizou-se a incisão do músculo detrusor.
- b) Grupo 2:** Realizado a incisão do músculo detrusor com implante de “scaffold” de matriz extracelular
- c) Grupo 3:** Realizado a incisão do músculo detrusor com implante de “scaffold” de matriz extracelular semeado com célula tronco mesenquimal derivada de gordura.
- d) Grupo 4:** Realizado a incisão do músculo detrusor com implante de “scaffold” de PGA.
- e) Grupo 5:** Realizado a incisão do músculo detrusor com implante de “scaffold” de PGA semeado com célula tronco mesenquimal derivada de gordura,

Os “scaffolds” de matriz extracelular utilizados foram provenientes do processo de descelularização de bexigas de outros nove animais da mesma raça. Os “scaffolds” de PGA foram doados por Dr Joseph Philipi Vacanti, do Harvard Institute.

Após o sacrifício dos animais, na quarta, oitava e décima segunda semana de implante, realizamos a análise histológica e funcional, a primeira com

Hematoxilina e Eosina e Tricômio de Masson, a segunda com estudo urodinâmico. Na coloração Hematoxilina e Eosina avaliamos os polimorfonucleares e mononucleares, na coloração Tricrômio de Masson avaliamos a área de colágeno e no estudo urodinâmico a capacidade cistométrica máxima e o volume onde se atinge a Pdet de 40 cm H₂O.

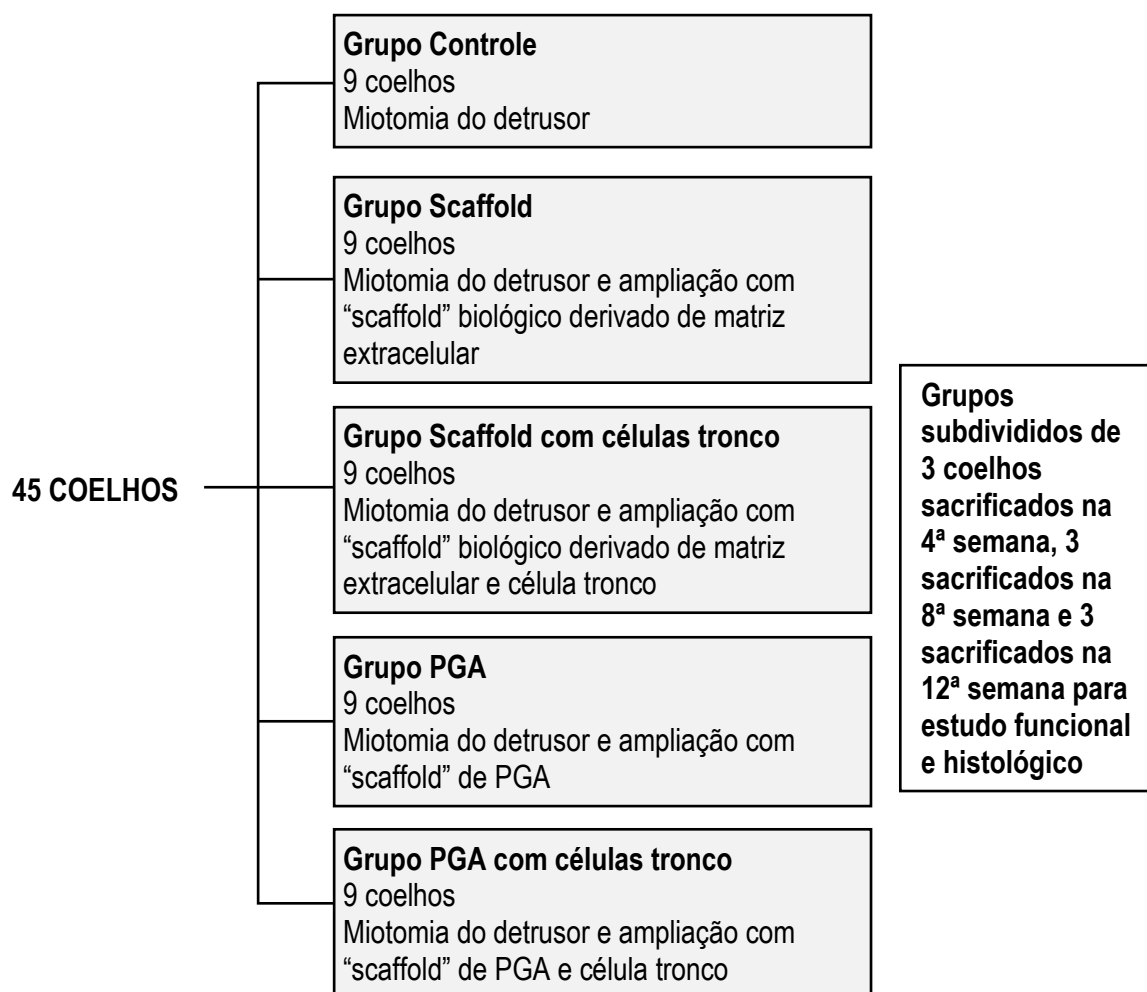


Figura 3. Delineamento experimental.

3.1. Coleta de tecido adiposo para célula tronco

A coleta de tecido adiposo dos coelhos foi realizada com anestesia através de uma injeção intramuscular de Quetamina (20 mg/Kg) e Xilazina (5 mg/kg). A cirurgia iniciou-se com uma incisão abdominal inferior de 3 cm de diâmetro, sendo realizada a dissecação por planos até aponeurose do músculo reto

abdominal. Realizou-se a dissecação e exérese de um fragmento de gordura inguinal. O fechamento da incisão foi feito com fio Nylon 4.0. No pós-operatório, todos os animais receberam Dipirona (50 mg/kg/dia) e Cefalexina (30 mg/kg/dia) por via intramuscular durante três dias.

O fragmento foi levado ao laboratório em solução tampão fosfato (PBS) para preparo da célula tronco derivada de gordura, figura 4 ⁽²²⁾.

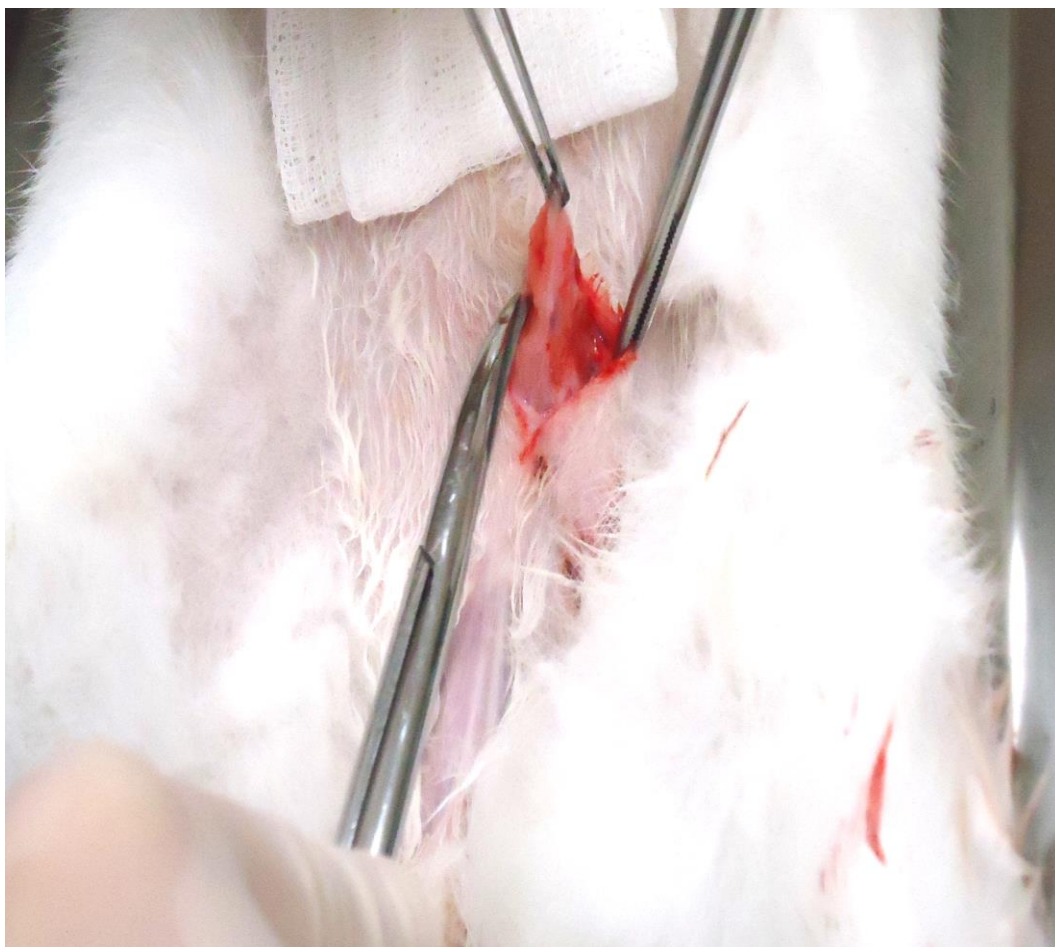


Figura 4. Incisão para coleta de gordura da região inguinal. Arquivo pessoal.

3.2. Isolamento e cultura de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo

O tecido adiposo, retirado da região inguinal dos coelhos foi pesado (aproximadamente 1g), lavado 3 vezes com solução de tampão sulfóxido (PBS), responsável por manter PH em diferentes meios, e fragmentado em pequenos pedaços. Em seguida, esses fragmentos foram colocados em solução de

colagenase, para a lise do colágeno, mantendo o tecido límpido. (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) 0,075% em PBS por 30 a 40 minutos em constante agitação e temperatura de 37°C ⁽²²⁾.

Na etapa seguinte a solução foi peneirada, poros de 100 micrômetros, a fim de se obter a fração celular estromal-vascular do tecido digerido. O tecido peneirado foi retirado e colocado em cubo cônico de 15 ml e centrifugado a 1200 rpm por 4 minutos.

Em seguida o sobrenadante retirado foi ressuspendido em 10 mL de *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), formulação suplementar que aumenta os aminoácidos e vitaminas suplementado com 10% soro fetal bovino o qual é meio de cultura para aumentar a produção de oócitos ---blastocisto e 1% de antibiótico (penicilina G + Estreptomicina) ⁽²²⁾.

As células foram semeadas em placas de cultivo de 100mm, e o meio de cultivo trocado a cada 24 a 36 horas para remoção de células não aderidas e eritrócitos. As células foram cultivadas até atingirem aproximadamente 80% de confluência, quando foram tripsinizadas, usando tripsina a 0,25% (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brasil), para a lise de proteínas e plaqueadas com concentração de 1×10^5 células/mL. O cultivo celular seguiu-se até a passagem 1 (P1), as quais as células foram caracterizadas pela citometria de fluxo ⁽²²⁾.

3.3. Caracterização de marcadores celulares das células tronco mesenquimais

As células tronco derivadas de tecido adiposo em P1 já haviam sido previamente caracterizadas pelo nosso laboratório, por citometria de fluxo pela incubação com os anticorpos de superfície específicos CD29+ (Chemicon-Millipore, Billerica, Massachusetts), CD44+(AbD Serotec, Kidlington, Oxford), CD45- (AbD Serotec, Kidlington, Oxford) ^(22,23,38).

3.4. Obtenção e preparo dos “scaffolds” de matriz extracelular

A cirurgia de cistectomia dos coelhos machos para construção do

“scaffold” foi realizada com a anestesia com xilazina (5 mg/kg) e quetamina (20 mg/kg) injetadas via intramuscular. A cistectomia total foi realizada e a peça enviada para o laboratório em solução tampão PBS para descelularização. Após este procedimento os animais foram eutanasiados com a superdosagem dos mesmos anestésicos.

3.4.1. Protocolo de descelularização do “scaffold” de matriz extracelular

Inicialmente as bexigas coletadas através de cistectomia, foram lavadas extensamente com PBS e abertas a partir de um corte longitudinal. Estas foram imersas em PBS e deixadas em constante agitação (shaker orbital) por 15 minutos.

O protocolo de descelularização, aproximadamente 48h, iniciou se com a lavagem das bexigas com tampão PBS contendo 10Kiu/mg de aprotinina, para inibir a fibrinólise (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 30 minutos em constante agitação (shaker orbital) ^(22,23).

Depois foram incubadas em água deionizada contendo 1% SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 24 horas, a temperatura ambiente, em constante agitação. Em seguida foram imersas em água deionizada por 2 períodos de 15 minutos em agitação e incubadas em água deionizada contendo 1% Triton X-100 (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) por 60 minutos, mantendo a agitação ^(22,23).

Finalmente foram lavadas cinco vezes com tampão PBS em constante agitação, esta solução foi trocada a cada 24 horas.

A figura 5 demonstra a bexiga de coelhos pré e pós o processo de decelularização acima descrito.

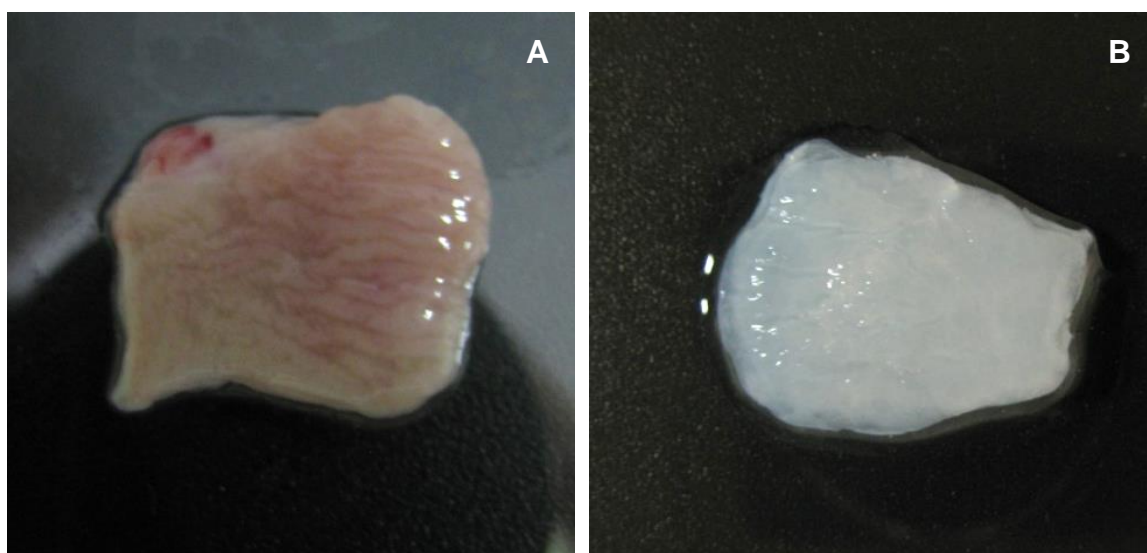


Figura 5. Bexiga de coelho pré (A) e pós (B) processo de descelularização. Arquivo pessoal.

3.5. Implante do “scaffold” na bexiga.

Os coelhos foram anestesiados com as drogas já descritas anteriormente. Realizou-se assepsia e antisepsia com solução de iodopovidona (0,27 a 0,82%). Foi realizada incisão mediana, com dissecação por planos musculares até a abertura do peritônio e exposição da bexiga. Em seguida foi realizada a dissecação do músculo detrusor até a exposição da mucosa vesical, sobre a qual foi implantado o “scaffold” de aproximadamente 1,5 cm². Este “scaffold” foi suturado ao músculo detrusor com pontos separados de Vycril 5.0, semeado ou não com célula tronco e recoberto por gordura pré-vesical, a fim de estimular a vascularização local. Após a implantação do “scaffold” de matriz extracelular e sobre o “scaffold” de PGA, aproximadamente 1 a 2x10⁶ de células tronco derivadas do tecido adiposo foram semeadas sobre estes. O local do implante foi marcado por quatro pontos cardinais de Nylon 6.0 no músculo detrusor adjacente ao implante para posterior identificação na análise histológica. A cavidade abdominal foi fechada por planos com sutura contínua de fios Vicryl 4.0 e a pele com Nylon 4.0. Abaixo estão as figuras 6 e 7, demonstrando o processo descrito acima.

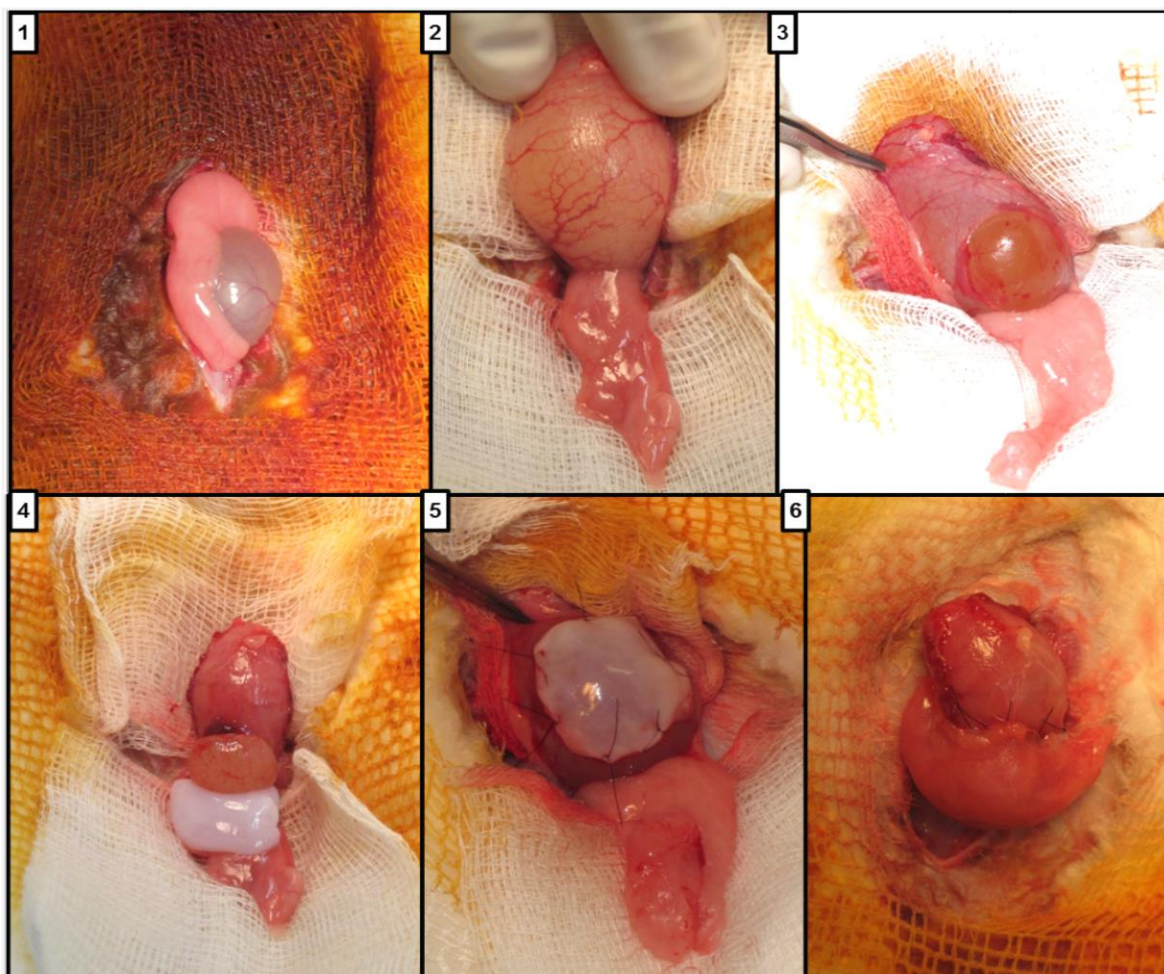


Figura 6. Técnica cirúrgica. 1) Exposição da bexiga; 2) Dissecção da área para implantação de scaffold; 3) Miotomia do detrusor; 4) Preparo para implante de “scaffold”; 5) Bexiga ampliada com “scaffold” de matriz extracelular e 6) Bexiga exposta para cistectomia. Arquivo pessoal.

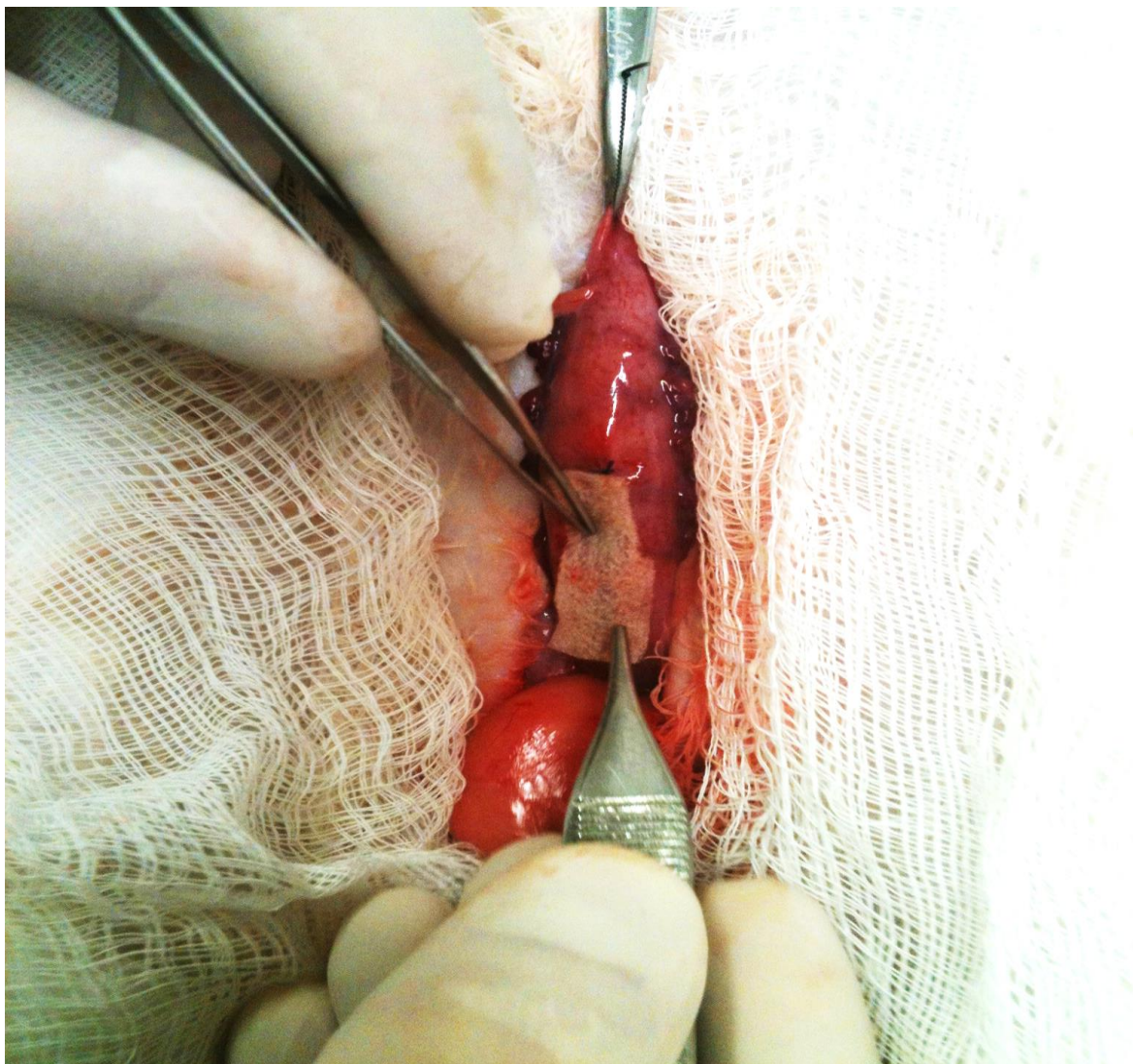


Figura 7. Implante de “scaffold” de PGA. Arquivo pessoal.

3.6. Cistectomia

Após 4, 8 e 12 semanas, de acordo com o protocolo deste estudo, foi realizada a cistectomia e enviado a peça para análise histológica composta pela área delimitada com pontos de nylon (área de implante de “scaffolds”). Em seguida, os coelhos foram sacrificados com super dosagem de Xilazina (5 mg/Kg), Quetamina (20 mg/Kg) e superdosagem de tiopental sódico endovenoso. A bexiga retirada foi colocada em solução de formalina 10% e encaminhada ao laboratório de patologia.

3.7. Avaliação Histológica

A análise histológica iniciou-se com a fixação das peças com solução de Bouin, a fim de se preservar a morfologia e composição tecidual. Em seguida, realizou-se a desidratação das peças cirúrgicas com concentrações crescentes de álcool, iniciando com álcool a 70% e finalizando com álcool absoluto a 100%. As peças foram incluídas em blocos retangulares de parafina.

3.7.1. Hematoxilina & Eosina

A análise com esta coloração identifica as células inflamatórias, polimorfonucleares (PMN), linfócitos, macrófagos e células gigantes de corpo estranho. Realizamos a marcação manual e a contagem com magnificação óptica de 400x, com auxílio software *ImageJ* e do plug-in *Cell Counter* (Figura 8, 9,10) ⁽²³⁾.

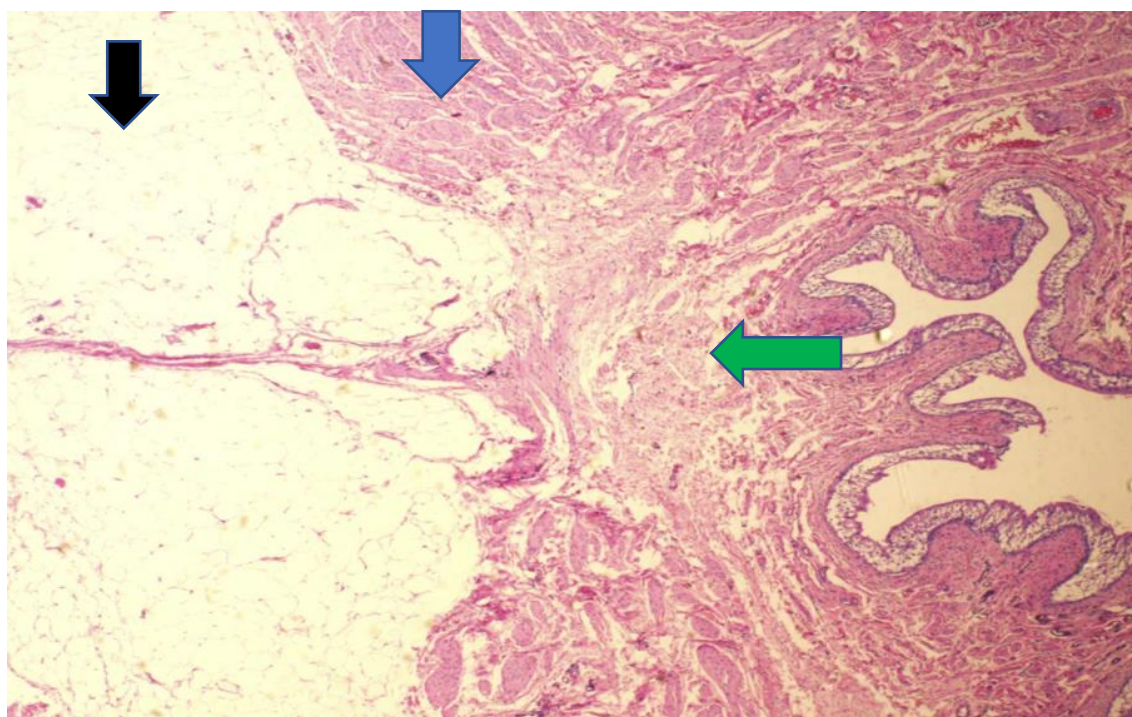


Figura 8. Lâmina de hematoxilina e eosina de coelho implantado PGA, seta preta path de gordura, seta azul o músculo detrusor e seta verde o “scaffold” de matriz (200x)

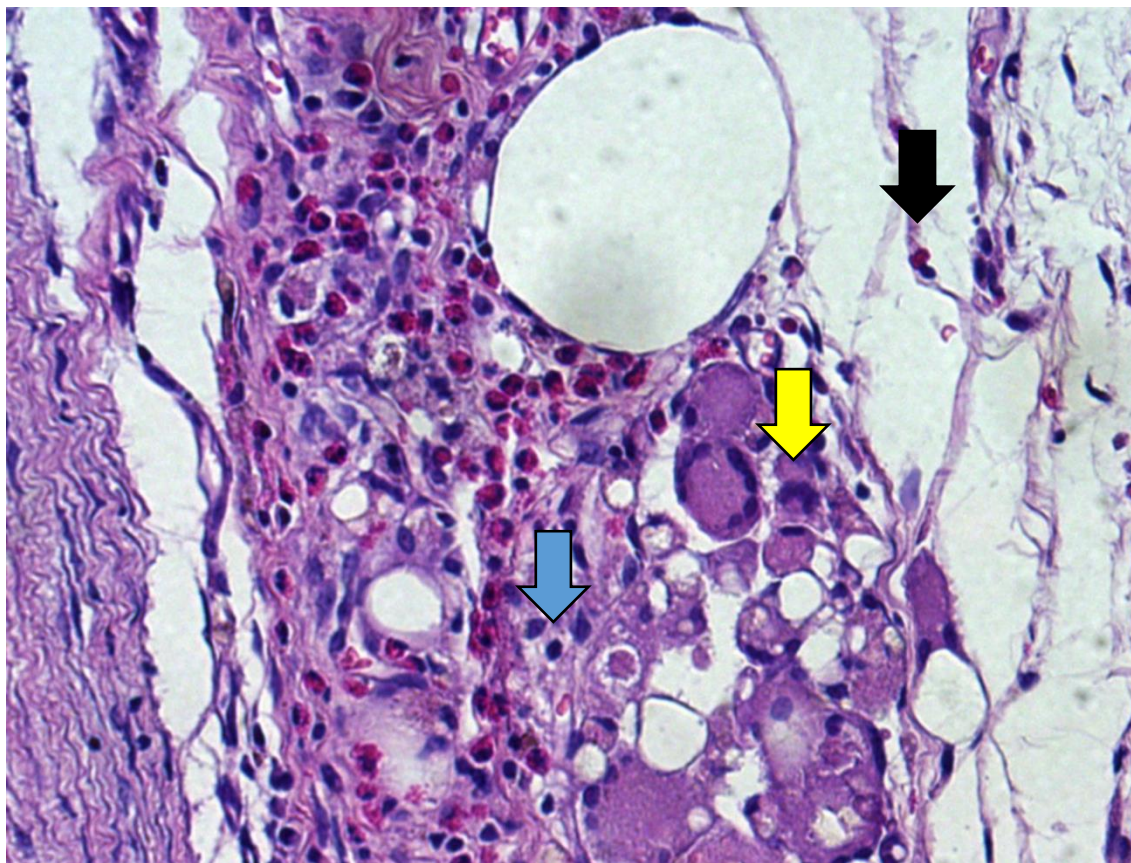


Figura 9. Lâmina de hematoxilina e eosina contagem celular, seta preta área de “scaffold” de PGA, seta amarela área com destaque nos tipos celulares e a seta azul, Linfócitos. (400x)

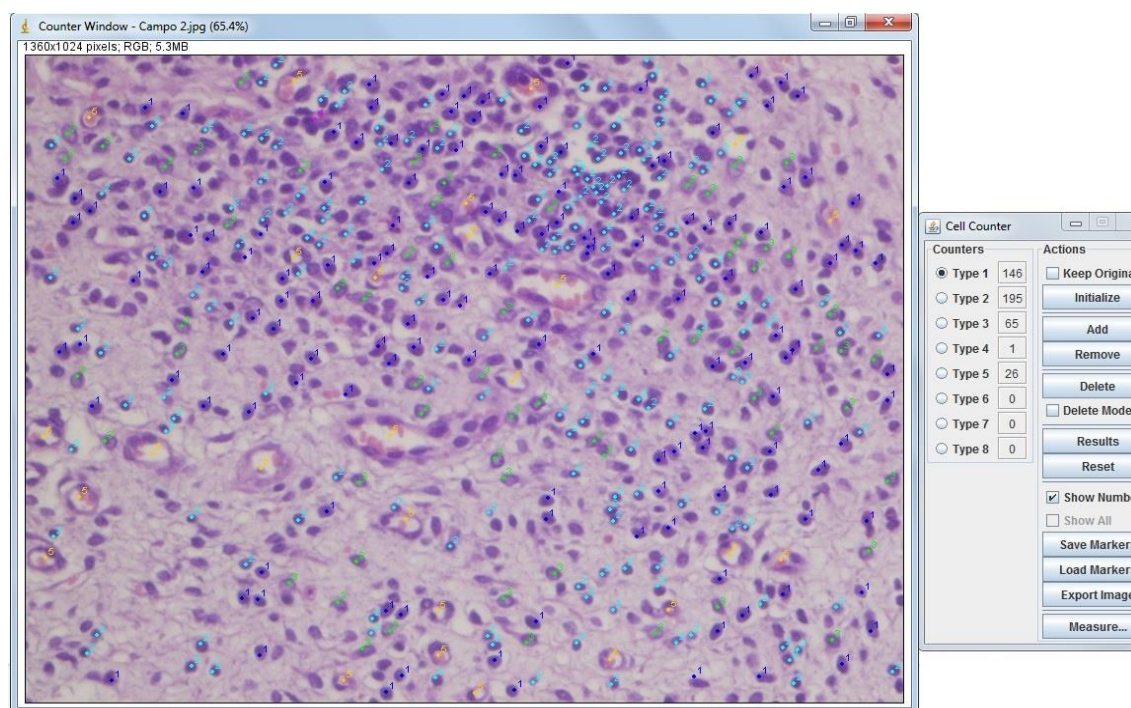


Figura 10. Campo contado com o programa *ImageJ* e auxílio do plug-in *Cell Counter*. “Type” 1 – polimorfonucleares; “Type” 2 – linfócitos; “Type” 3 – macrófagos; “Type” 4 - células gigantes de corpo estranho; “Type” 5 - vasos sanguíneos.

3.7.2. Tricrômio de Masson

A avaliação foi realizada medindo-se a área onde se encontrava a maior densidade de fibroblastos e colágeno, denominada área de fibrose, neste processo usamos a magnificação óptica de 200 vezes e foram avaliados três campos em cada lâmina histológica de Tricômio de Masson. O “software” utilizado para a mensuração da área foi o *ImageJ* com o auxílio do plug-in *Threshold Colour* ⁽³⁰⁾, figuras 11 e 12.

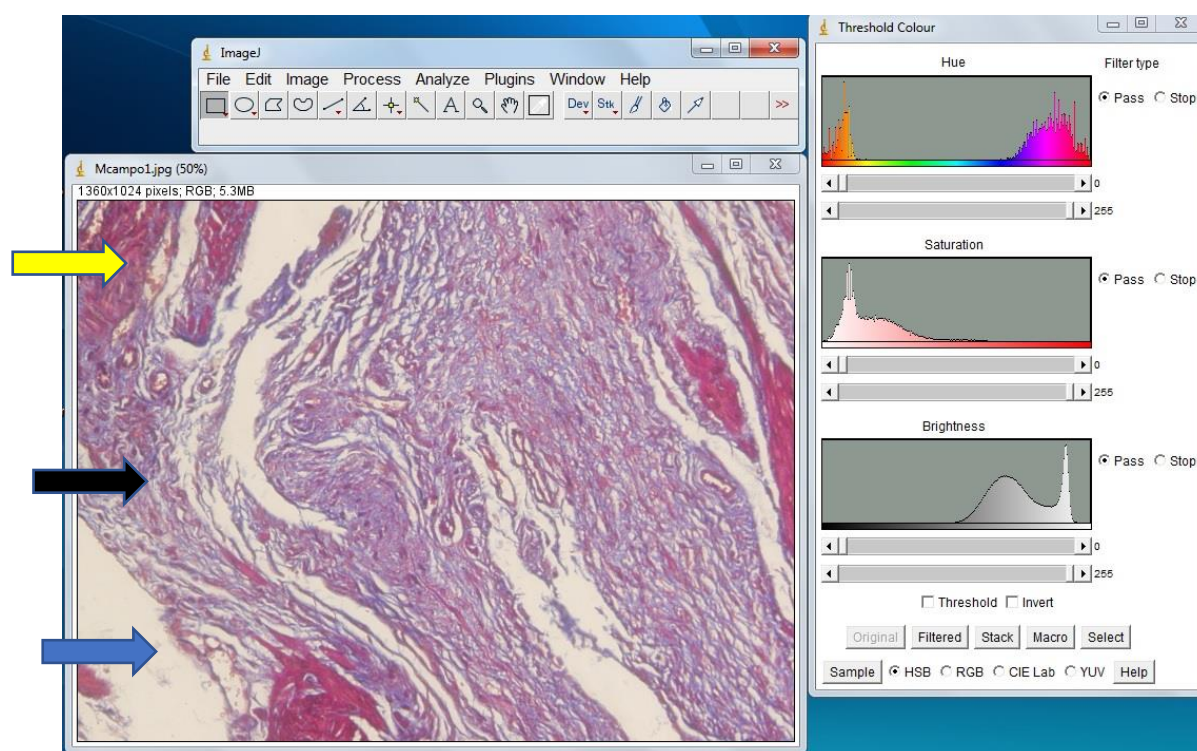


Figura 11. Lâmina de Tricrômio de Masson com magnificação óptica de 200 vezes, abaixo do “software” *ImageJ* e lateral ao plug-in *Threshold Colour*. Seta preta, o scaffold de matriz, seta azul, o tecido adiposo e a seta amarela, o músculo detrusor.

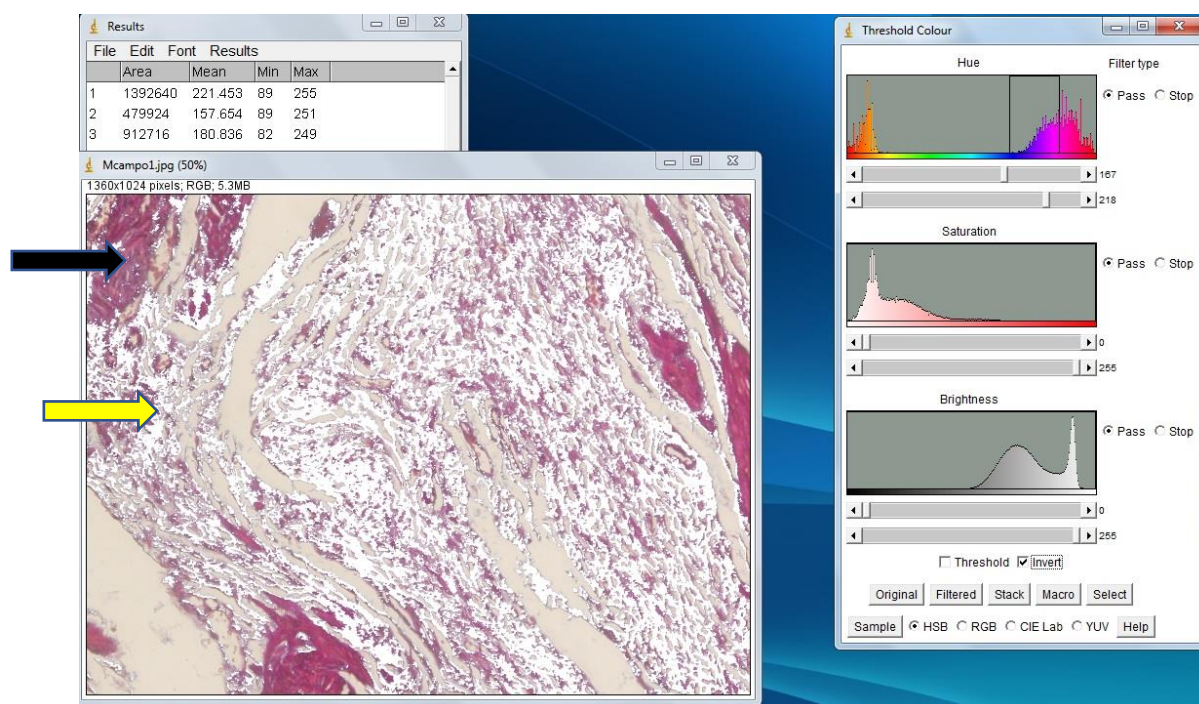


Figura 12. Lâmina de Tricrômio de Masson, seta amarela representa o colágeno e a seta preta o músculo detrusor

A figura 12 é semelhante a figura 11, porém já com a área complementar (não referente ao colágeno) selecionada a partir do botão “Invert” do plug-in, abrangendo toda a escala de cores complementar à anteriormente selecionada. Essa área é processada pelo “software” e mostrada em tabela “Results” (acima da imagem do campo), sendo “1” referente à área total do campo (em pixels); “2” à área de colágeno (anteriormente selecionada, em azul); e “3” à área complementar.

3.8. Avaliação funcional

A análise funcional foi realizada em todos os coelhos, no momento de inicial e antes do sacrifício. O teste foi realizado com aparelho de urodinâmico da Dynamed (Dynamed, São Paulo – Brasil) com sonda de duplo lúmen ⁽²⁴⁾. (Figuras 13 e 14).

Os parâmetros urodinâmicos analisados foram:

- 1) **Capacidade cistométrica máxima (CCM):** definida como volume

intravesical, em ml, até o momento da primeira observação de perda urinária, momento onde oclui-se a uretra;

- 2) Volume vesical onde atinge se a pressão detrusora de 40 cmH₂O (VPdet40 cmH₂O).



Figura 13. Coelho durante exame, com sonda uretral de duplo lúmen.

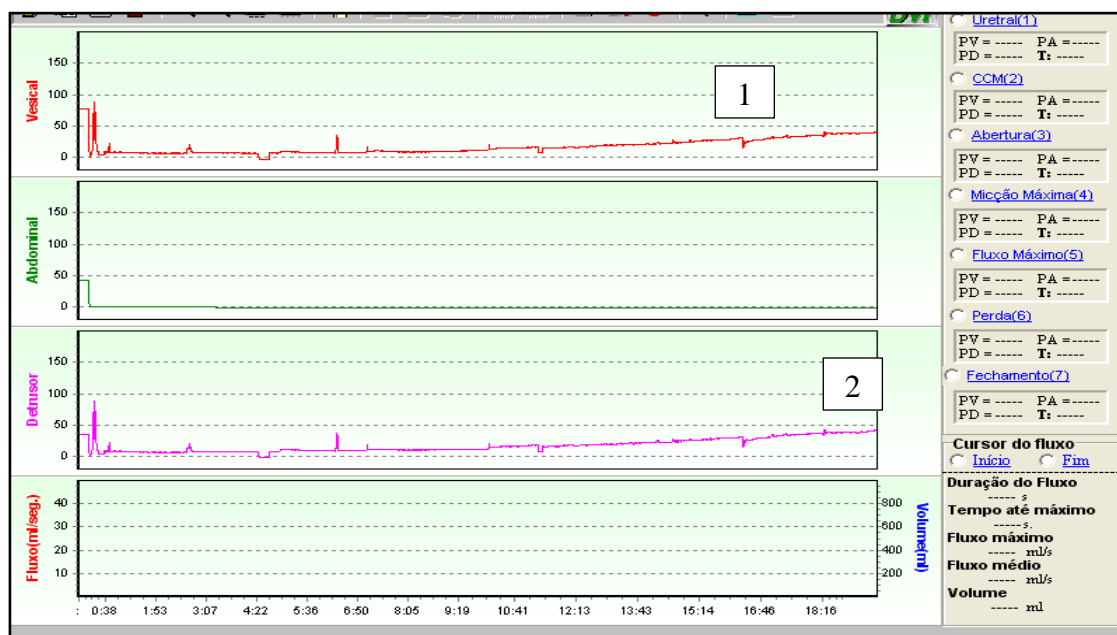


Figura 14. Estudo urodinâmico em coelhos demonstrando no ponto 1, a Capacidade cistométrica máxima e no ponto 2, o VPdet40 cmH₂O.

3.9. Análise estatística-descritiva

A análise estatística foi inicialmente feita de forma descritiva através da média, mediana, valores mínimo e máximo e desvio-padrão.

A análise estatística foi inicialmente feita de forma descritiva através da média, mediana, valores mínimo e máximo e desvio-padrão.

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram: Kruskal-Wallis e o teste de Dunn ou Bonferroni os quais são métodos estatístico usados para fazer um número específico de comparações entre grupos de dados e descobrir qual deles é significativo. Os 2 testes foram usados na comparação de polimorfos nucleares, linfócitos, macrófagos, capacidade cistométrica máxima, volume onde foi atingido a pressão vesical de 40 cm H₂O e área do colágeno, entre os 5 grupos nos diferentes tempos de análise, com descrito no delineamento experimental.

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância alfa igual a 5%.

Os dados foram digitados em planilhas do Excel 2010 for Windows para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico R versão 3.5.1.

4 RESULTADOS

4.1. Análise de polimorfonucleares (PMN)

A quantificação de PMN com 4ª semana foi semelhante entre os cinco grupos. Na 8ª semana, o grupo controle apresentou menos polimorfonucleares comparado aos grupos "scaffold", "scaffold" com célula tronco e PGA, ($p=0,032$) (Tabelas 1 e 2). Neste mesmo período, o grupo PGA semeado com célula tronco também apresentou menos PMN que o grupo "scaffold" semeado com célula tronco (Tabelas 1 e 2; Anexo 2). Na 12ª semana, o grupo controle e o grupo PGA apresentaram menos PMN que o grupo "scaffold". O grupo PGA com célula tronco apresentou menor quantidade de PNM que "scaffold" e "scaffold" com célula tronco ($p=0,033$) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Avaliação da presença de polimorfonucleares na área de implante vesical, de acordo com tempo de intervenção e grupo estudado.

Semana	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	p*
4	controle	3	31,57	39,00	11,80	43,91	17,30	0,364
	scaffold	3	59,72	50,19	47,93	81,05	18,50	
	scaffold+célula tronco	2	56,06	56,06	54,32	57,80	2,46	
	PGA	3	50,07	42,20	20,30	87,70	34,38	
	PGA+célula tronco	3	29,73	12,70	5,30	71,20	36,10	
8	controle	3	9,34	8,98	6,58	12,46	2,96	0,032
	scaffold	3	51,70	54,21	43,49	57,39	7,28	
	scaffold+célula tronco	3	59,42	57,02	46,07	75,16	14,69	
	PGA	3	55,13	57,00	48,19	60,20	6,22	
	PGA+célula tronco	3	18,07	14,60	7,90	31,70	12,27	
12	controle	3	10,78	9,95	9,45	12,93	1,88	0,033
	scaffold	3	59,99	61,82	48,71	69,45	10,49	
	scaffold+célula tronco	3	49,50	51,87	39,80	56,82	8,75	
	PGA	3	11,40	15,00	3,30	15,90	7,03	
	PGA+célula tronco	2	5,20	5,20	3,40	7,00	2,55	

*Kruskal-Wallis

Tabela 2. Resultados das comparações múltiplas pelo método de Dunn entre os grupos para polimorfonucleares.

Conclusão na semana 8	p	Conclusão na semana 12	p
controle < PGA	0,018	controle = PGA	0,922
controle = PGA+célula tronco	0,648	controle = PGA+célula tronco	0,513
PGA = PGA+célula tronco	0,055	PGA = PGA+célula tronco	0,458
controle < scaffold	0,045	Controle < scaffold	0,032
PGA = scaffold	0,715	PGA < scaffold	0,040
PGA+célula tronco = scaffold	0,121	PGA+célula tronco < scaffold	0,010
controle < scaffold+célula tronco	0,014	controle = scaffold+célula tronco	0,097
PGA = scaffold+célula tronco	0,927	PGA = scaffold+célula tronco	0,118
PGA+célula tronco < scaffold+célula tronco	0,045	PGA+célula tronco < scaffold+célula tronco	0,032
scaffold = scaffold+célula tronco	0,648	scaffold = scaffold+célula tronco	0,626

4.2. Análise de linfócitos

A quantificação de linfócitos mostrou que na 4^o semana, o grupo de PGA apresentou mais linfócitos que o grupo “scaffold”. O grupo “scaffold” semeados com célula tronco apresentou menos linfócitos que os grupos controle e PGA ($p=0,04$) (Tabelas 3 e 4; Anexo 3). Na semana 8^o, os coelhos com PGA apresentavam mais linfócitos que os coelhos com “scaffold”, “scaffold” com célula tronco e PGA com célula tronco ($p=0,025$) (Tabelas 3 e 4; Anexo 3). Na semana 12, o grupo de PGA teve mais linfócitos que o grupo “scaffold”, e o grupo “scaffold” com célula-tronco teve menos linfócitos que o grupo controle e PGA ($p=0,026$) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Avaliação da presença de linfócitos na área de implante vesical, de acordo com tempo de intervenção e grupo estudado.

Semana	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	p*
4	controle	3	33,69	30,67	23,85	46,55	11,65	0,040
	scaffold	3	25,31	17,78	13,76	44,38	16,64	
	scaffold+célula tronco	2	13,28	13,28	9,06	17,50	5,97	
	PGA	3	104,33	74,50	45,30	193,20	78,33	
	PGA+célula tronco	3	19,07	18,70	18,70	19,80	0,64	
8	controle	3	48,68	43,57	41,23	61,25	10,95	0,025
	scaffold	3	19,18	24,01	7,71	25,82	9,97	
	scaffold+célula tronco	3	27,57	31,24	14,78	36,70	11,41	
	PGA	3	111,23	112,70	67,00	154,00	43,52	
	PGA+célula tronco	3	23,50	21,50	16,50	32,50	8,19	
12	controle	3	45,82	49,83	34,82	52,82	9,65	0,026
	scaffold	3	19,25	21,81	12,82	23,11	5,60	
	scaffold+célula tronco	3	12,00	10,45	9,16	16,39	3,86	
	PGA	3	48,23	43,30	43,10	58,30	8,72	
	PGA+célula tronco	2	35,05	35,05	28,70	41,40	8,98	

*Kruskal-Wallis

Tabela 4. Resultados das comparações múltiplas pelo método de Dunn entre os grupos para linfócitos.

Conclusão na semana 4	p	Conclusão na semana 8	p
controle = PGA	0,379	controle = PGA	0,411
controle = PGA+célula tronco	0,283	controle = PGA+célula tronco	0,100
PGA = PGA+célula tronco	0,051	PGA > PGA+célula tronco	0,014
controle = scaffold	0,204	controle = scaffold	0,055
PGA > scaffold	0,032	PGA > scaffold	0,006
PGA+célula tronco = scaffold	0,845	PGA+célula tronco = scaffold	0,784
controle > scaffold+célula tronco	0,044	controle = scaffold+célula tronco	0,171
PGA > scaffold+célula tronco	0,005	PGA > scaffold+célula tronco	0,028
PGA+célula tronco = scaffold+célula tronco	0,294	PGA+célula tronco = scaffold+célula tronco	0,784
scaffold = scaffold+célula tronco	0,382	scaffold = scaffold+célula tronco	0,584

Conclusão na semana 12	p
controle = PGA	0,845
controle = PGA+célula tronco	0,432
PGA = PGA+célula tronco	0,337
controle = scaffold	0,064
PGA > scaffold	0,040
PGA+célula tronco = scaffold	0,383
Controle > scaffold+célula tronco	0,011
PGA > scaffold+célula tronco	0,006
PGA+célula tronco = scaffold+célula tronco	0,138
scaffold = scaffold+célula tronco	0,495

4.3. Análise de macrófagos

A quantificação de macrófagos na 4ª semana mostrou que o grupo “scaffold” apresentou menos macrófagos que o grupo PGA e PGA com célula tronco ($p=0,033$) (tabelas 5, 6 e anexo 4). Na 8ª semana, o grupo “scaffold” e célula tronco teve menos macrófagos que o grupo PGA e PGA com célula tronco ($p=0,034$) (tabelas 5 e 6; Anexo 4). Na 12ª segunda semana não houve diferença entre os grupos com relação a presença de macrófagos.

Tabela 5. Avaliação da presença de macrófagos na área de implante vesical, de acordo com tempo de intervenção e grupo estudado.

Semana	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	p*
4	controle	3	31,32	31,99	20,33	41,65	10,68	0,033
	scaffold	3	14,92	7,66	5,19	31,90	14,76	
	scaffold+célula tronco	2	30,67	30,67	28,18	33,15	3,51	
	PGA	3	61,80	66,00	38,10	81,30	21,90	
	PGA+célula tronco	3	81,43	84,90	74,50	84,90	6,00	
8	controle	3	41,98	46,32	29,77	49,85	10,72	0,034
	scaffold	3	29,10	32,44	16,79	38,08	11,03	
	scaffold+célula tronco	3	13,02	11,75	10,06	17,24	3,75	
	PGA	3	75,83	77,20	44,70	105,60	30,47	
	PGA+célula tronco	3	61,40	52,20	41,60	90,40	25,67	
12	controle	3	43,40	40,72	37,22	52,25	7,86	0,131
	scaffold	3	20,76	17,73	16,37	28,19	6,47	
	scaffold+célula tronco	3	38,47	38,97	32,73	43,71	5,51	
	PGA	3	48,97	50,30	39,60	57,00	8,78	
	PGA+célula tronco	2	38,60	38,60	24,70	52,50	19,66	

* Kruskal-Wallis

Tabela 6. Resultados das comparações múltiplas pelo método de Dunn entre os grupos para macrófagos.

Conclusão na semana 4	p	Conclusão na semana 8	p
controle = PGA	0,241	controle = PGA	0,315
controle = PGA+célula tronco	0,051	controle = PGA+célula tronco	0,465
PGA = PGA+célula tronco	0,434	PGA = PGA+célula tronco	0,784
controle = scaffold	0,329	controle = scaffold	0,361
PGA > scaffold	0,032	PGA = scaffold	0,055
PGA+célula tronco > scaffold	0,003	PGA+célula tronco = scaffold	0,100
controle = scaffold+célula tronco	0,896	controle = scaffold+célula tronco	0,083
PGA = scaffold+célula tronco	0,238	PGA > scaffold+célula tronco	0,006
PGA+célula tronco = scaffold+célula tronco	0,060	PGA+célula tronco > scaffold+célula tronco	0,014
scaffold = scaffold+célula tronco	0,458	scaffold = scaffold+célula tronco	0,411

4.4. Análise de célula gigante de corpo estranho (CGCC)

A quantificação de **CGCC** com 4^a, 8^a e 12^a semanas foi semelhante entre nos cinco grupos avaliados na quarta e oitava semana. Na 12^a semana o grupo controle, "scaffold" e "scaffold" com célula tronco apresentavam menor quantidade de células que os grupos com "scaffolds" sintéticos, PGA e PGA com célula tronco ($p=0,015$) (Tabelas 7, 8 e Anexo 5).

Tabela 7. Avaliação da presença de células gigantes de corpo estranho, na área de implante vesical, de acordo com tempo de intervenção e grupo estudado.

Semana	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	p*
4	controle	3	3,42	0,25	0,00	10,00	5,70	0,190
	scaffold	3	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	
	scaffold+célula tronco	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	PGA	3	2,20	2,10	2,00	2,50	0,26	
	PGA+célula tronco	3	2,87	1,60	0,00	7,00	3,67	
8	controle	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,174
	scaffold	3	0,02	0,00	0,00	0,06	0,03	
	scaffold+célula tronco	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	PGA	3	2,13	3,00	0,00	3,40	1,86	
	PGA+célula tronco	3	0,96	1,27	0,00	1,60	0,84	
12	controle	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,015
	scaffold	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	scaffold+célula tronco	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	PGA	3	0,93	1,00	0,40	1,40	0,50	
	PGA+célula tronco	2	3,50	3,50	0,80	6,20	3,82	

*Kruskal-Wallis

Tabela 8. Resultados das comparações múltiplas pelo método de Dunn entre os grupos para CGEE.

Conclusão na semana 12	p
controle = PGA	0,023
controle = PGA+célula tronco	0,022
PGA = PGA+célula tronco	0,799
controle = scaffold	>0,999
PGA > scaffold	0,023
PGA+célula tronco = scaffold	0,022
controle > scaffold+célula tronco	>0,999
PGA > scaffold+célula tronco	0,023
PGA+célula tronco = scaffold+célula tronco	0,022
scaffold = scaffold+célula tronco	>0,999

4.5. Análise da capacidade cistométrica máxima (CCM)

O volume da CCM na 4ª e 8ª semanas pós cirurgia, foi semelhante nos cinco grupos. Na 12ª semana observamos que a CCM do grupo “scaffold” de PGA era menor que a CCM nos coelhos ampliados com “scaffold” de matriz extracelular e scaffold de PGA semeado com célula tronco. ($p=0,021$ e $p=0,02$, respectivamente) (Tabela 9, Figuras 15, 16, 17, Anexos 6, 7, 9, 10 e 11).

4.6. Análise do volume vesical na pressão detrusora de 40 cmH₂O (VPdet40)

O volume do VPdet.40 cmH₂O foi semelhante nos cinco grupos na quarta e oitava semana. Na décima segunda semana, os grupos “scaffold” de matriz extra celular e “scaffold” de PGA semeados com célula tronco apresentavam uma VPdet.40 cmH₂O maior que os coelhos do grupo controle e do grupo PGA ($p=0,013$ e $p=0,049$) (Tabela 9, Figuras 18, 19, 20, Anexos 6, 8, 10 e 11).

Tabela 9. Resultados das comparações múltiplas pelo método de Dunn entre os grupos para o aumento da capacidade cistométrica máxima (CCM) e volume vesical na pressão detrusora de 40 cmH₂O (VPdet40)

Conclusão para CCM na semana 12	p	Conclusão para VPdet40 na semana 12	p
controle = PGA	0,197	controle = PGA	0,714
controle = PGA+célula tronco	0,080	controle = PGA+célula tronco	0,013
PGA = PGA+célula tronco	0,002	PGA = PGA+célula tronco	0,004
controle = scaffold	0,311	controle = scaffold	0,336
PGA > scaffold	0,021	PGA = scaffold	0,184
PGA+célula tronco > scaffold	0,461	PGA+célula tronco = scaffold	0,130
controle = scaffold+célula tronco	0,712	controle = scaffold+célula tronco	0,049
PGA = scaffold+célula tronco	0,097	PGA > scaffold+célula tronco	0,019
PGA+célula tronco = scaffold+célula tronco	0,167	PGA+célula tronco > scaffold+célula tronco	0,614
scaffold = scaffold+célula tronco	0,519	scaffold = scaffold+célula tronco	0,313

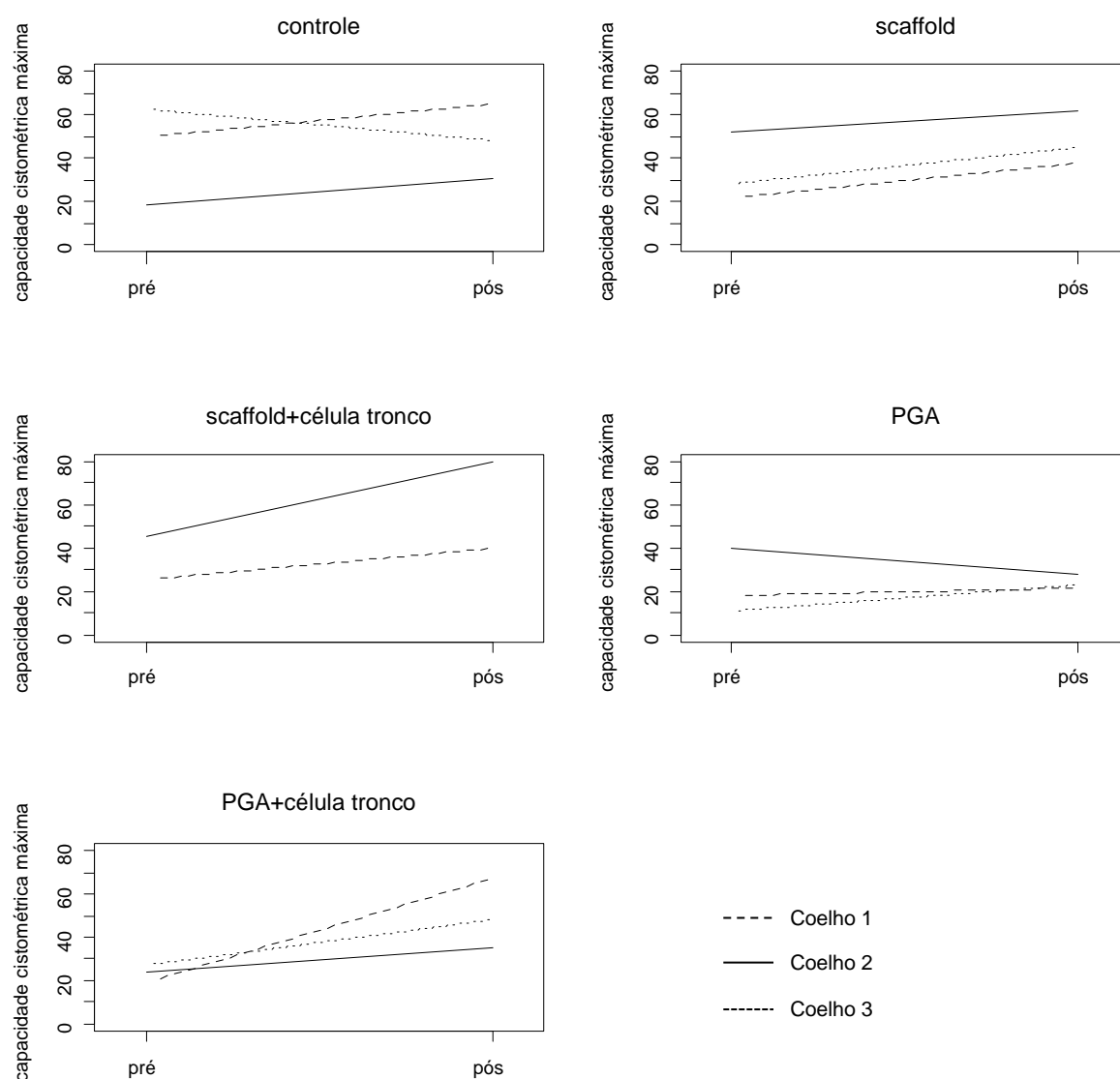


Figura 15. Variação da capacidade cistométrica máxima na quarta semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados.

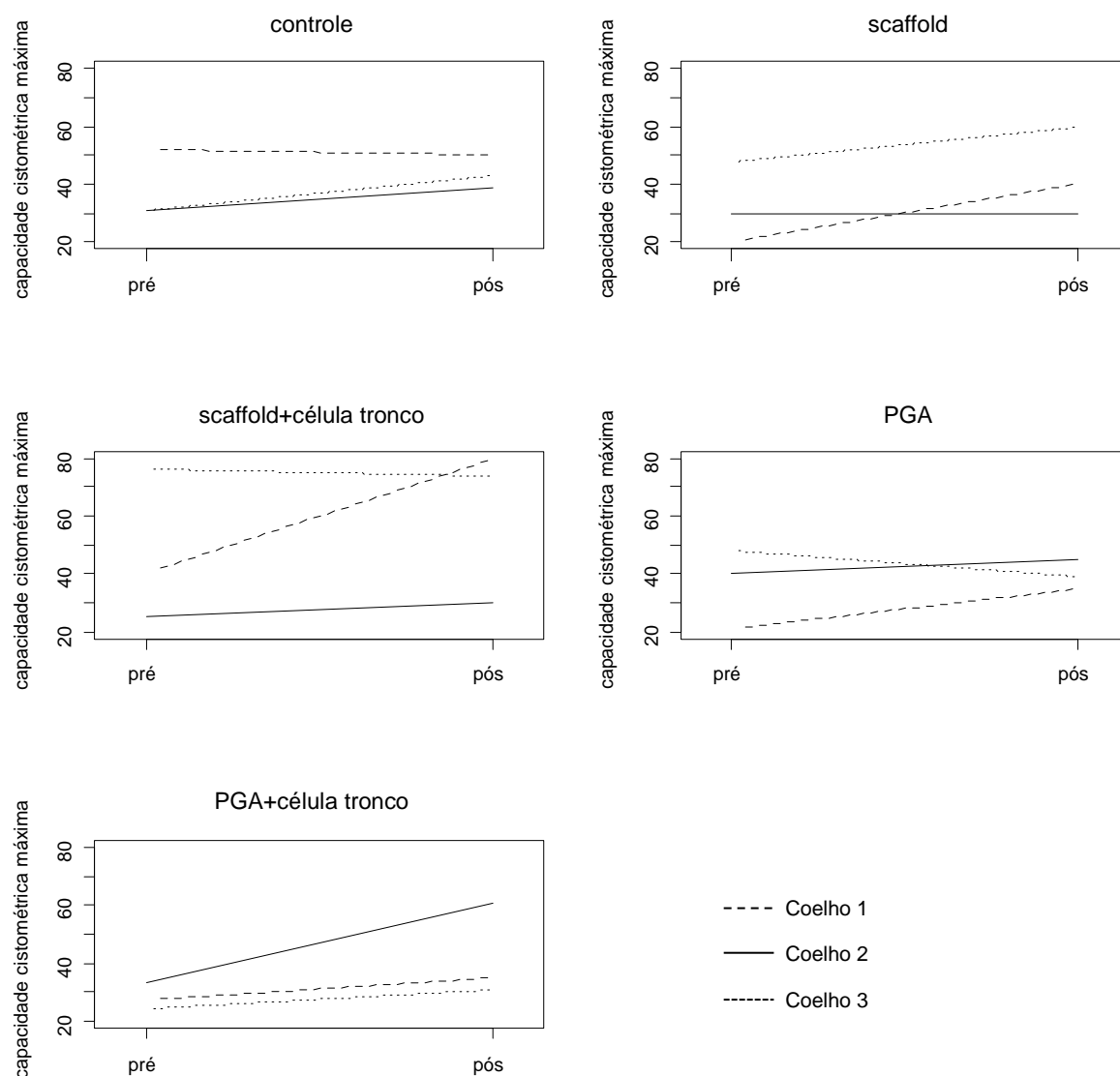


Figura 16. Variação da capacidade cistométrica máxima na oitava semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados.

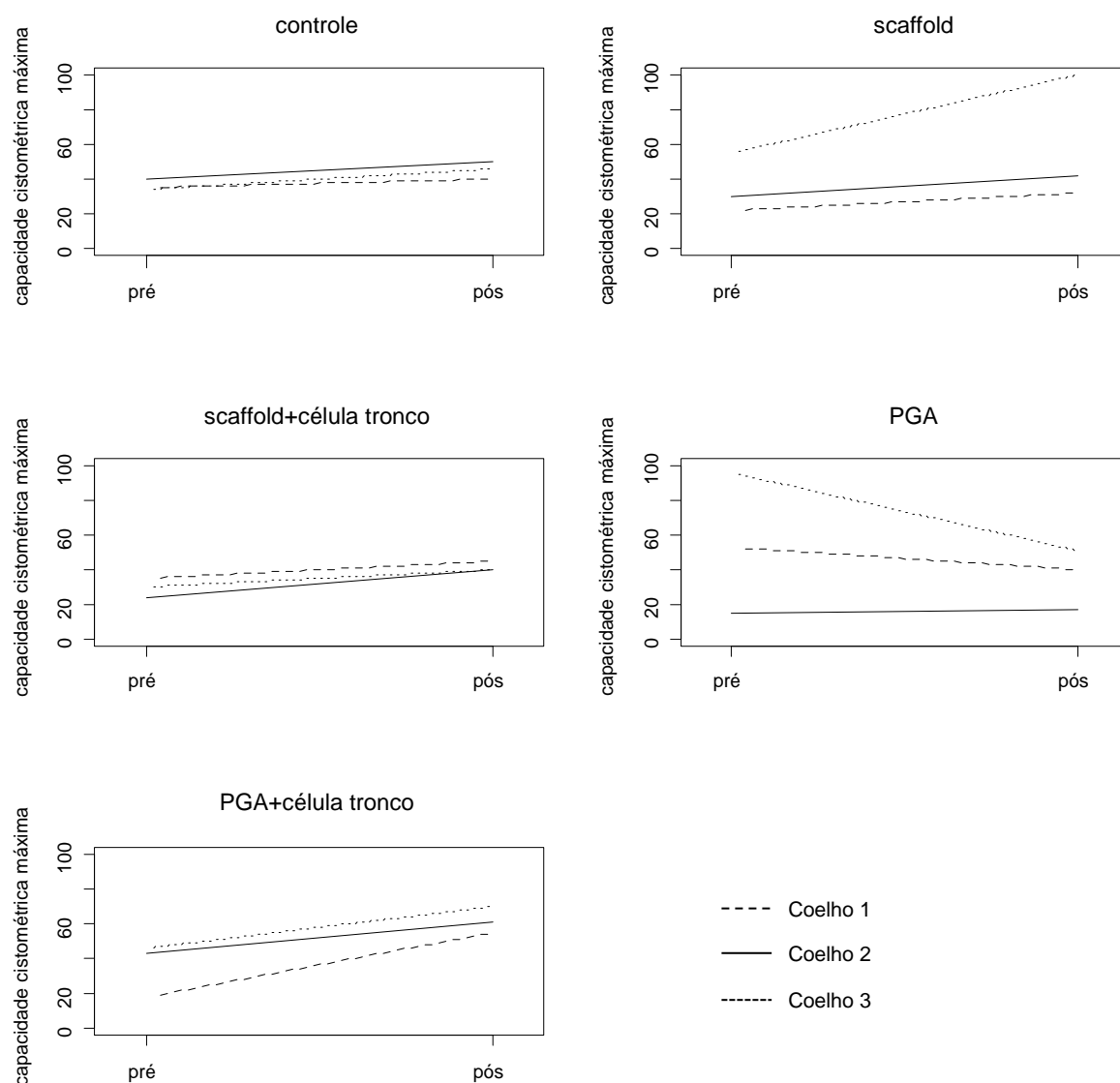


Figura 17. Variação da capacidade cistométrica máxima na décima segunda semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados.

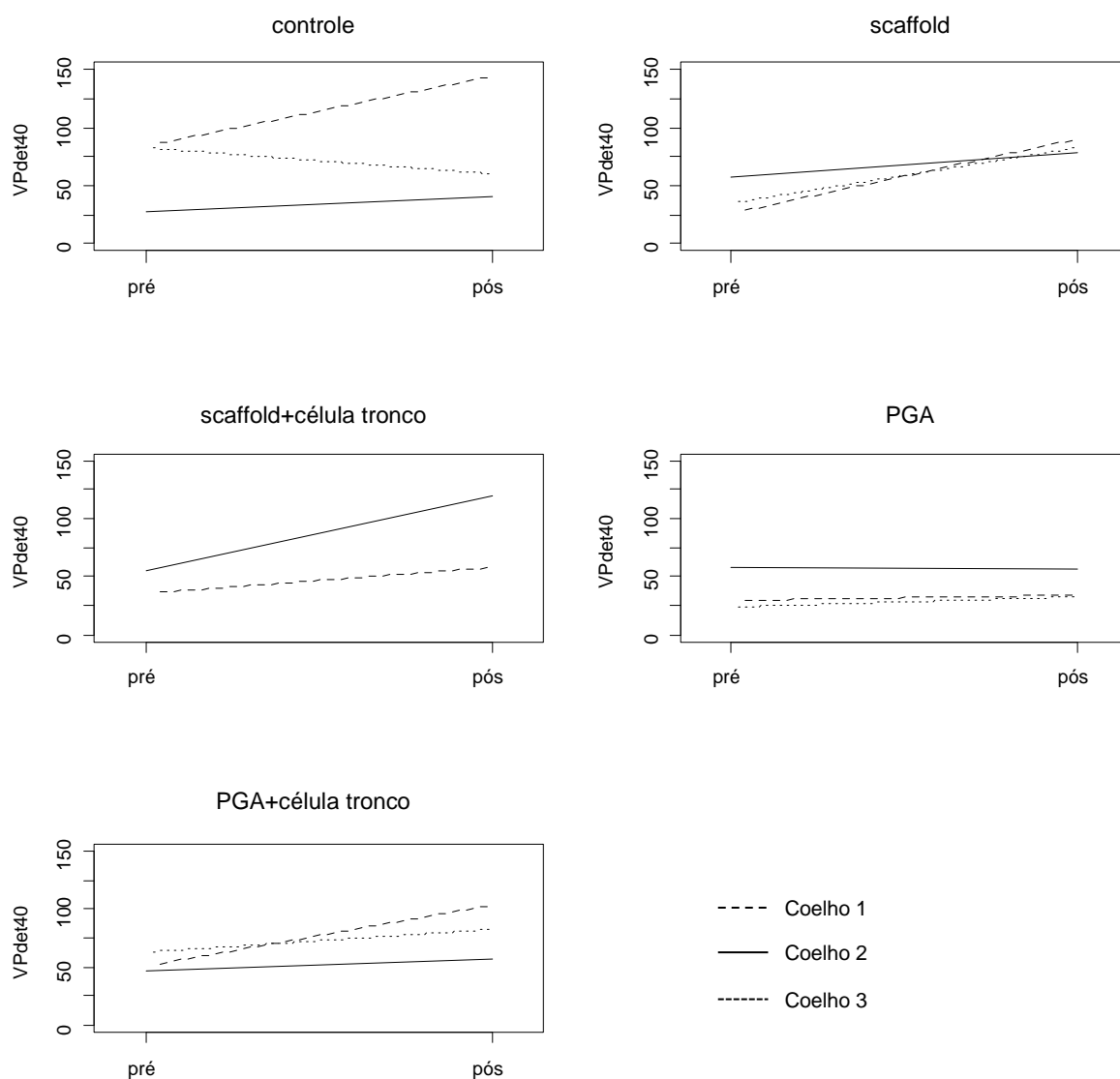


Figura 18. Variação do volume vesical na pressão detrusora de 40 na quarta semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados.

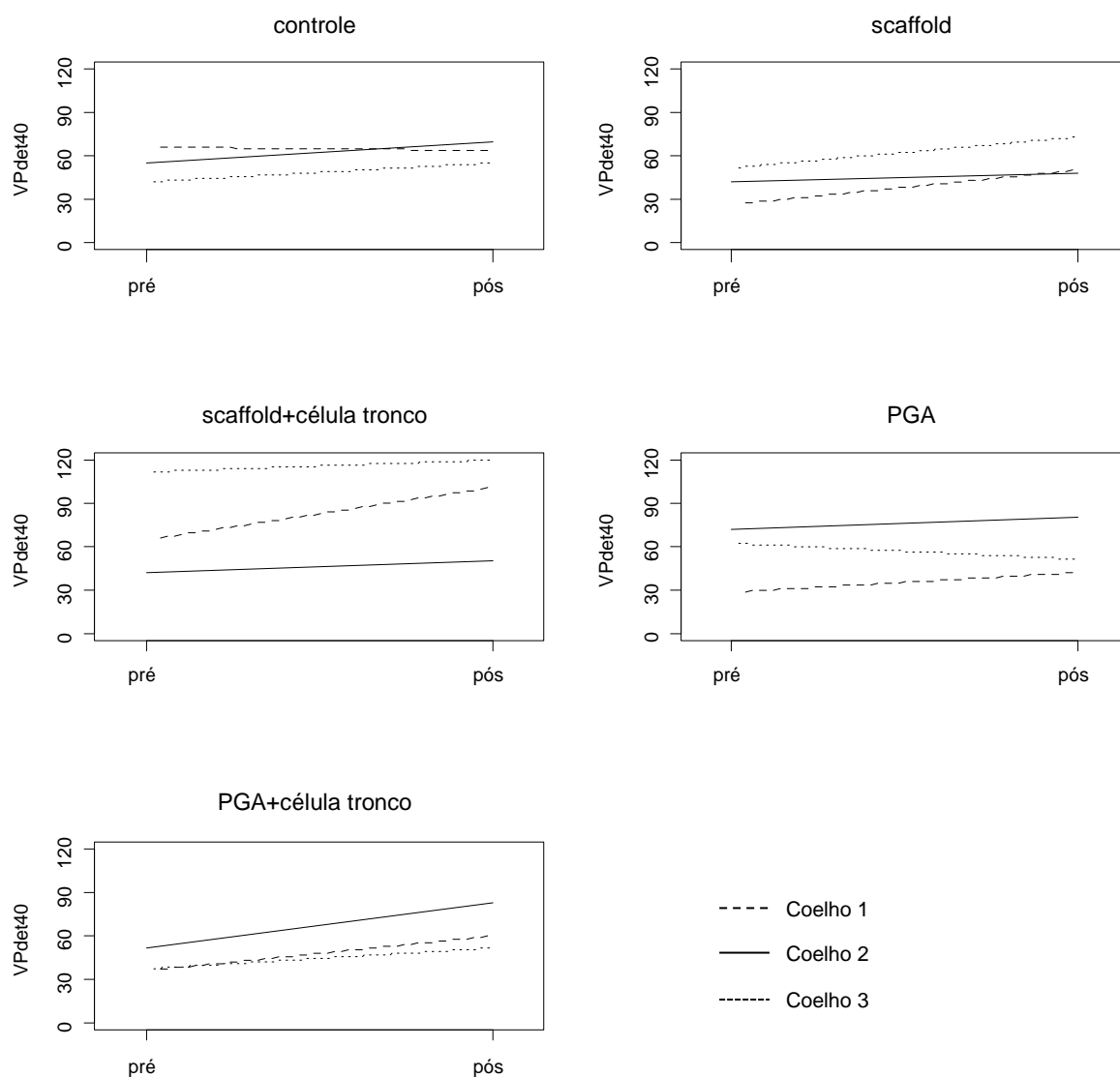


Figura 19. Variação do volume vesical na pressão detrusora de 40 na oitava semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados.

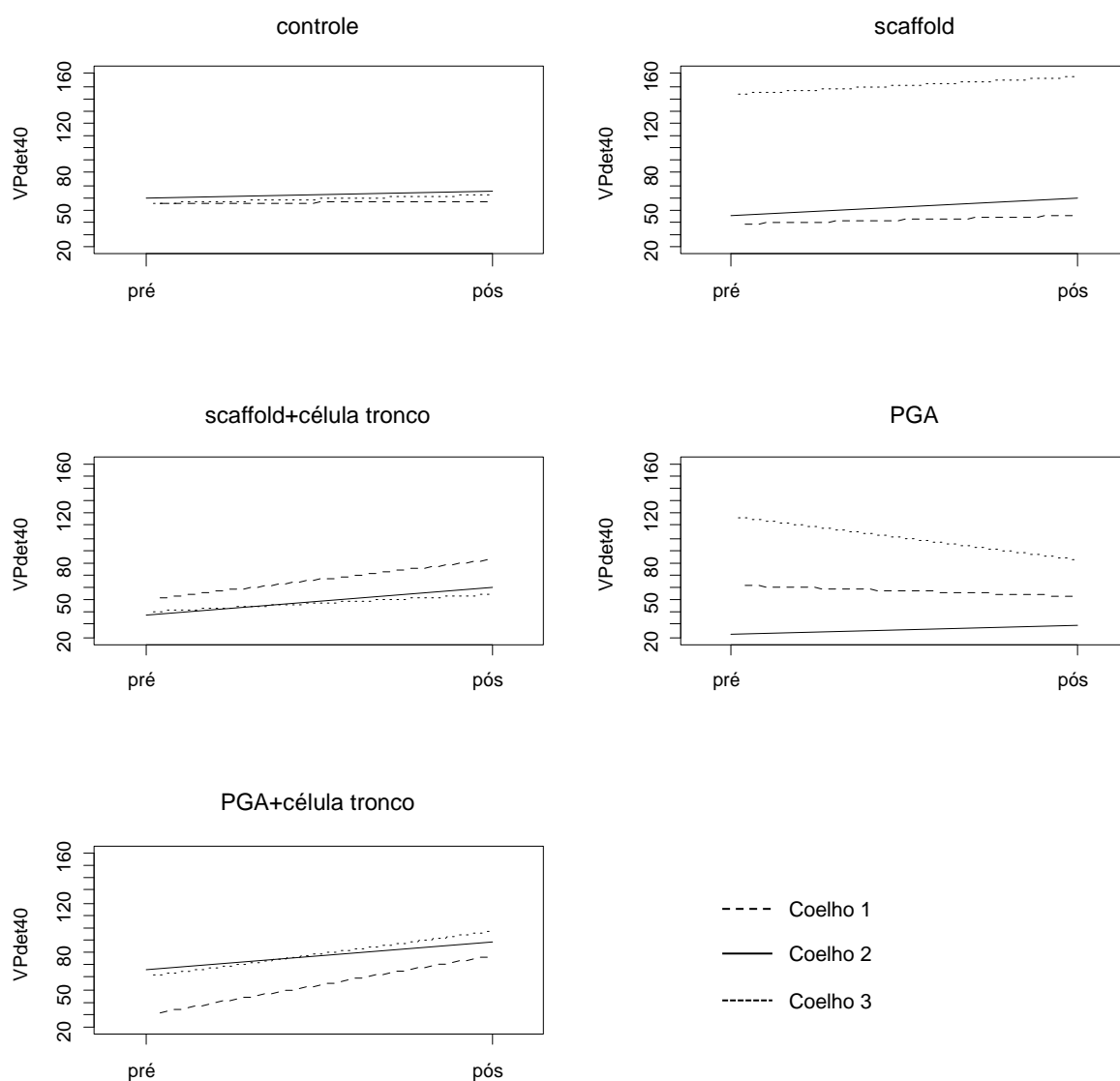


Figura 20. Variação do volume vesical na pressão detrusora de 40 na décima semana pós intervenção nos diferentes dos grupos avaliados.

4.7. Avaliação quantitativa de colágeno

A área do colágeno não apresentou diferença significativa entre os grupos nas semanas 4 ($p=0,329$) e 8 ($p=0,191$). Notamos uma tendência do grupo "scaffold" semeado com célula tronco apresentar maior área de colágeno quando comparado aos grupos controle e "scaffold" na semana 12 ($p=0,061$) (Tabela 10 e Anexo 12).

Tabela 10. Avaliação da área do colágeno (%), na área de implante vesical, de acordo com tempo de intervenção e grupo estudado.

Semana	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	p*
4	controle	3	34,77	21,20	20,40	62,70	24,19	0,329
	scaffold	3	35,80	38,10	30,90	38,40	4,25	
	scaffold+célula tronco	2	27,70	27,70	14,10	41,30	19,23	
	PGA	2	24,56	24,56	23,13	25,99	2,02	
	PGA+célula tronco	2	13,52	13,52	12,37	14,67	1,63	
8	controle	2	66,40	66,40	62,40	70,40	5,66	0,191
	scaffold	3	32,77	26,40	25,70	46,20	11,64	
	scaffold+célula tronco	3	50,63	59,00	14,50	78,40	32,76	
	PGA	3	30,97	32,64	22,48	37,80	7,79	
	PGA+célula tronco	3	19,00	17,17	16,10	23,73	4,13	
12	controle	3	27,40	27,10	16,40	38,70	11,15	0,061
	scaffold	3	39,53	30,60	22,50	65,50	22,85	
	scaffold+célula tronco	3	76,73	75,40	73,30	81,50	4,26	
	PGA	3	34,77	21,20	20,40	62,70	24,19	
	PGA+célula tronco	3	35,80	38,10	30,90	38,40	4,25	

*Kruskal-Wallis

5 DISCUSSÃO

A luz de nosso conhecimento, até o presente momento, nenhum estudo fez a comparação histológica e funcional da ampliação vesical com “scaffold” biológico de matriz extracelular e sintético de PGA semeados e não semeados com célula tronco mesenquimal autóloga derivada de tecido adiposo ⁽³²⁾.

Neste estudo investigamos a viabilidade da ampliação vesical em coelhos por meio da utilização de “scaffold” de matriz extracelular e “scaffold” sintético (PGA) semeados ou não semeados com células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo autóloga. Avaliamos a histologia para traçar uma analogia com as reações celulares inflamatórias que ocorrem no transplante de órgãos e ou tecidos, realizado em humanos. Neste cenário podemos ter quadros inflamatórios importantes ou até rejeições, e a característica comum é a presença expressiva de polimorfonucleares, linfócitos e os macrófagos, arterite, sangramento intersticial e microtrombose ⁽¹⁹⁾.

A reação inflamatória a qual leva a rejeição dos enxertos alogênicos e heterólogo é o principal desafio nos transplantes de órgãos, esta rejeição pode ser hiperaguda, aguda e crônica ⁽³⁸⁾. Este fato é amenizado porque utilizamos tecidos autólogos e “scaffolds” biológicos os quais são semelhantes a matriz inata, como a célula tronco derivada de tecido adiposo e o scaffold de matriz extracelular, como já encontrado em estudos anteriores ^(39,40).

O uso das células tronco autólogas minimizou o efeito da incompatibilidade imunológica. Na análise histológica foi demonstrado o aumento celular significativo de polimorfonucleares e linfócitos, contudo não foi constatado arterite, sangramento intersticial ou microtrombose, características histológicas presentes no quadro de rejeição de enxertos. Neste cenário, as células pluripotentes podem ter diminuído a possibilidade de rejeição ^(37,41,27).

A análise da viabilidade da ampliação com “scaffolds” foi investigada com a histologia e com a cistometria. Na análise quantitativa de polimorfonucleares, o grupo ampliado com “scaffold” de matriz extracelular apresentou um aumento significativo, ao longo do tempo, comparado com controle (**p= 0,033**), e na análise quantitativa de linfócitos, o grupo ampliado com “scaffold” de matriz extracelular

apresentou menor quantidade celular comparado com controle (**p= 0,011**) e menor quantidade também comparado ao grupo ampliado com PGA (**p= 0,006**). A análise de macrófagos ao final das 12 semanas não apresentou alterações significantes as quais eram vistas na 4ª e 8ª semana, demonstrando que independente do enxerto ao final da 12ª semana esse se apresentou biocompatível e com comportamento semelhante ao grupo controle.

Na análise de células gigantes de corpo estranho houve maior número celular no grupo PGA e PGA com célula tronco, ou seja, maior reação inflamatória, porém, sem relevância clínica.

A análise cistométrica demonstrou significativo aumento do volume quando atinge-se pressão detrusora de 40 cmH₂O, nos grupos PGA com semeadura de célula tronco e “scaffold” de matriz extra celular semeado com célula tronco, demonstrando o papel imunoregenerador da célula tronco nestes dois grupos. Esta análise pode nos inferir um possível aumento na complacência vesical e na própria capacidade de armazenamento vesical, visto que diante de uma pressão de 40 cmH₂O, o volume armazenado foi significativamente maior. Esta análise de aumento do volume no ponto de pressão de 40 cmH₂O, pode nos sugerir uma melhora da complacência vesical e podemos pensar em realizar em estudos futuros a análise da complacência vesical.

Na análise da capacidade cistométrica máxima, foi demonstrada que os enxertos não diminuíram a CCM, comparados ao grupo controle. O grupo “scaffold” de PGA semeado com célula tronco apresentou tendência em aumentar a CCM, uma amostra com número maior de animais poderia resultar em uma significância deste parâmetro, neste grupo.

No grupo PGA sem a semeadura da célula tronco ocorreu a piora da CV, demonstrando que “scaffold” de PGA apresentou uma reação inflamatória acentuada a qual não permitiu a melhora deste propriedade.

Na análise da área de colágeno, que nos infere a área cicatricial ou fibrose, foi demonstrada que os grupos com “scaffold” de matriz ou de PGA geraram fibrose semelhante ao grupo controle, assim esta fibrose não prejudicou os

parâmetros funcionais como a CCM e VPdet40. Sabemos que a fibrose diminui a capacidade cistométrica como demonstrado em diversos estudos prévios ⁽⁴²⁾.

Baseado no nosso estudo, observamos que o maior potencial para aplicação clínica parece estar em ampliação com scaffold de MEC e PGA ambos semeados com célula tronco, já que houve a melhora na complacência vesical nestas duas técnicas, com mínima reação inflamatória e com melhora da complacência vesical.

A biocompatibilidade foi evidenciada mesmo sem o uso de drogas imunossupressoras, como usado no transplante de órgãos, ou seja, uma técnica de transplante de tecidos, que dispensa o uso de drogas potentes, medicações geradoras de indesejáveis efeitos colaterais e que aumentam a incidência de neoplasias ⁽⁴³⁾.

O avanço nos últimos anos em pesquisas de engenharia tecidual para reconstrução da bexiga resultou em diversos ensaios pré-clínicos e até mesmo ensaios clínicos ⁽²⁴⁾. No presente estudo, investigamos a viabilidade da ampliação vesical em coelhos por meio da utilização de “scaffold” de matriz extracelular e “scaffold” sintético (PGA) semeados ou não com células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.

A melhora do déficit da complacência vesical e da capacidade cistométrica nos pacientes neurogênicos é a meta principal para a proteção do trato urinário superior ^(28,29).

A literatura já demonstrou a morbimortalidade das ampliações vesicais com seguimentos intestinais, devido complexidade técnica e porte cirúrgico, assim a busca de técnicas menos invasivas se faz necessária ⁽¹²⁾.

Os “scaffolds” de matriz extracelular ou sintéticos são alternativas menos invasivas ⁽³⁰⁾. Quando semeamos com célula tronco mesenquimal, a atividade imunomoduladora, regenerativa e anti inflamatória é potencializada assim a ampliação vesical com “scaffold” sintético ou de matriz extracelular se torna alternativa factível ⁽³¹⁾.

Estudos anteriores já ratificaram a importância do uso de materiais como alternativas aos tecidos nativos, o uso de telas para correção de hérnias, uso de telas para correção de prolapso vaginais e uso de mucosa de oral na cirurgia de estreitamentos uretrais são exemplos disto ⁽⁴⁴⁾.

Neste trabalho estudamos o implante vesical de “scaffold” biológico ou sintético, uma técnica segura, menos mórbida e eficaz de ampliação vesical comparado com a clássica enterocistoplastia ⁽³³⁾.

A minimização do tempo de hospitalização e o aumento das taxas de sucesso terapêutico são objetivos primários no desenvolvimento da engenharia de tecidos na urologia reconstrutiva ⁽³⁴⁾. A busca ativa de tecidos biologicamente viáveis com baixa reação inflamatória e com menor morbidade é foco importante na atualidade entre os pesquisadores ^(35,36,37). Sabemos que os resultados desta pesquisa impulsionam novos estudos para este tema.

O número reduzido de animais em cada grupo estudado foi uma deficiência deste estudo, contudo o fato de não haver artigo semelhante na literatura, destaca esta iniciativa. A característica principal deste estudo é provar novos conceitos e elevar o número de animais geraria um problema ético e aumentaria sobremaneira os custos. Por outro lado, nossos resultados permitiram identificar duas possíveis alternativas de ampliação vesical para realização de um estudo mais amplo. Desta forma, pretendemos realizar estudo controlado com maior número de animais comparando os grupos ampliados com “scaffold” de PGA e “scaffold” de MEC semeados com célula tronco derivado de tecido adiposo.


6 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que o implante de “scaffold” de matriz extracelular ou enxerto sintético de PGA, semeado ou não por células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo autólogo gerou mínima reação inflamatória, apresentou biocompatibilidade e não apresentou rejeição.

Coelhos ampliados com “scaffolds” de matriz extracelular e de ácido poliglicólico (PGA), ambos semeados com célula tronco derivado de tecido adiposo, foram integrados a bexiga nativa e apresentaram uma melhora significativa do volume vesical na pressão de 40 cm H₂O.

7 ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

 <p>UNIFESP UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO</p>	<p>Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina</p>	<p>Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo</p>
--	--	---

São Paulo, 25 de setembro de 2017

CEP Nº **0274/12**
CONEP Nº:

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Tatiana Pinotti Guirao

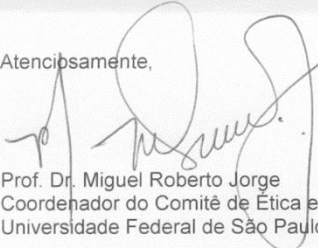
Disciplina/Departamento: Urologia/Cirurgia

Título do estudo: AMPLIAÇÃO VESICAL COM SCAFFOLD DE MATRIZ EXTRA-CELULAR VESICAL HETERÓLOGA ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU E APROVOU o(a) Emenda 1 (Versão de 15/Set/2017) Solicitação de mudança do pesquisador principal de, "Tatiana Pinotti Guirao" para "Fernando Gonçalves de Almeida" e inclusão de, "Wagner Aparecido França" como pesquisador associado. do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

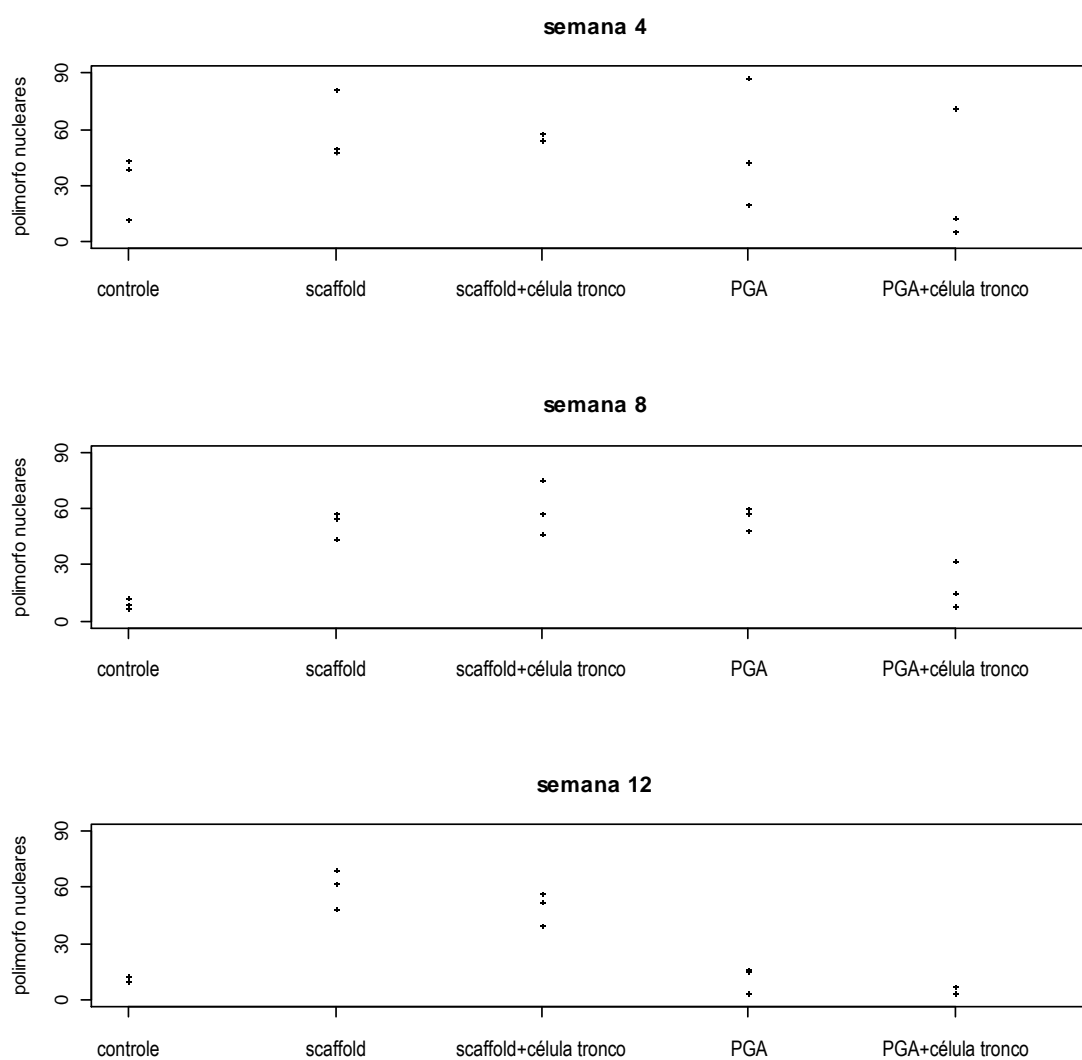


Prof. Dr. Miguel Roberto Jorge
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

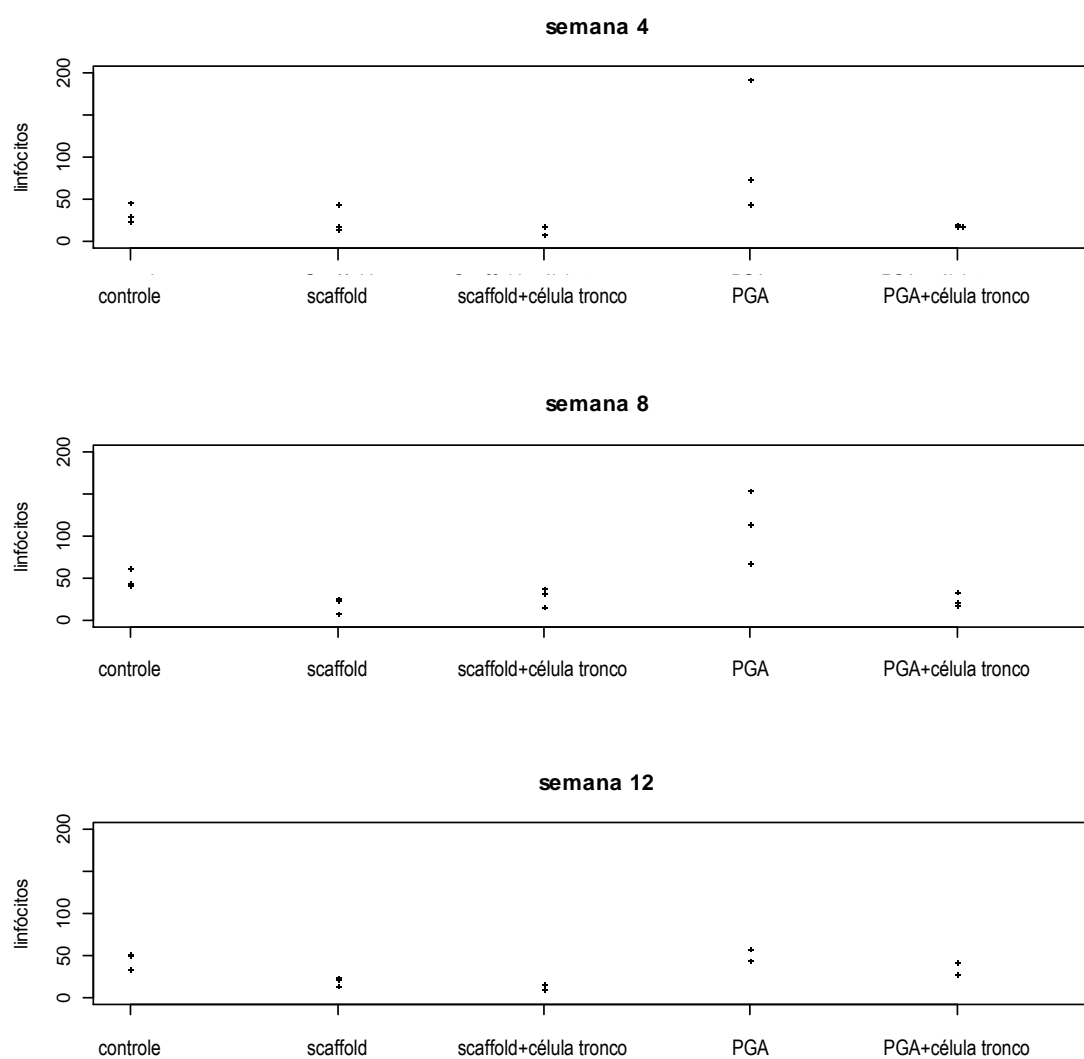
Página 1 de 1

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil

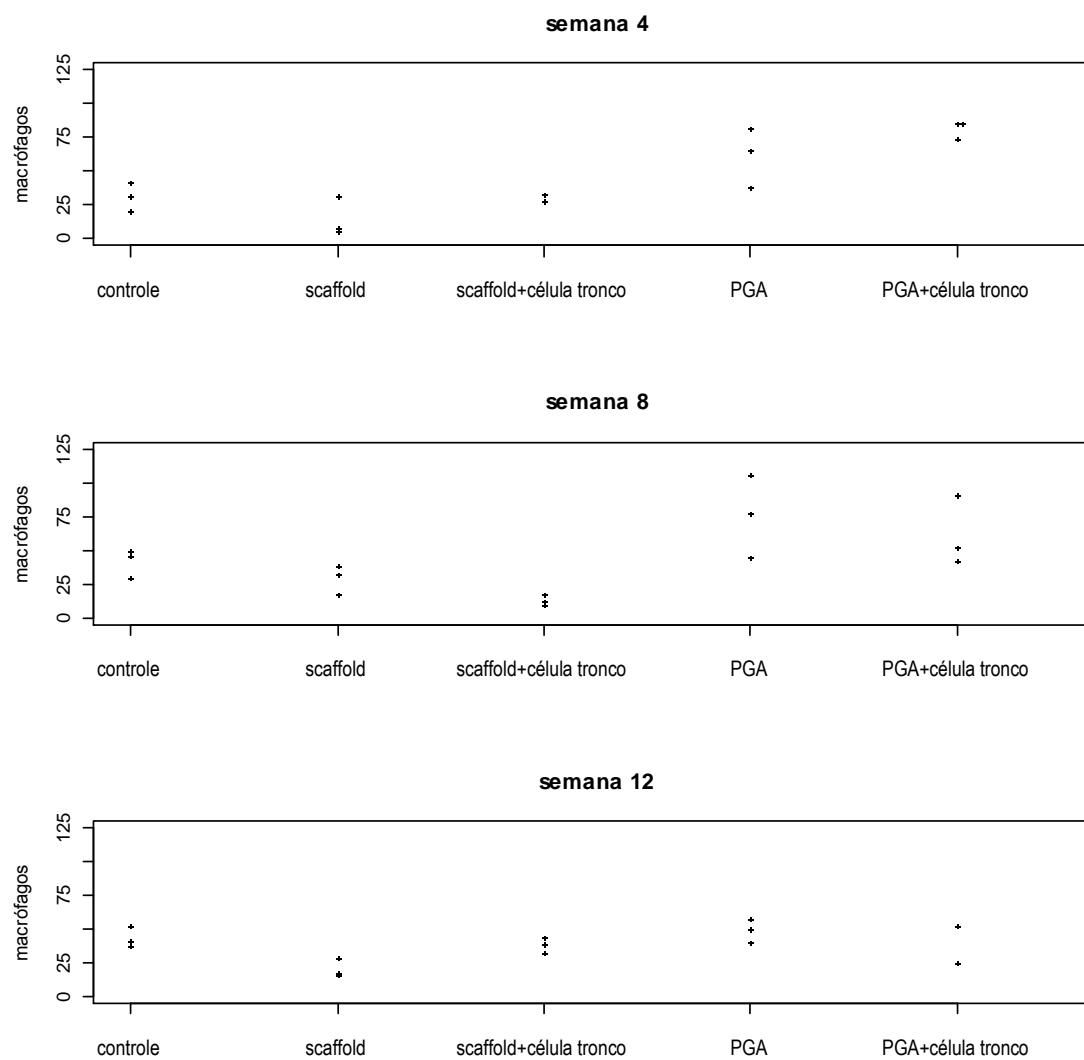
Anexo 2. Diagrama de dispersão unidimensional dos polimorfonucleares dos animais, segundo semana e grupo.



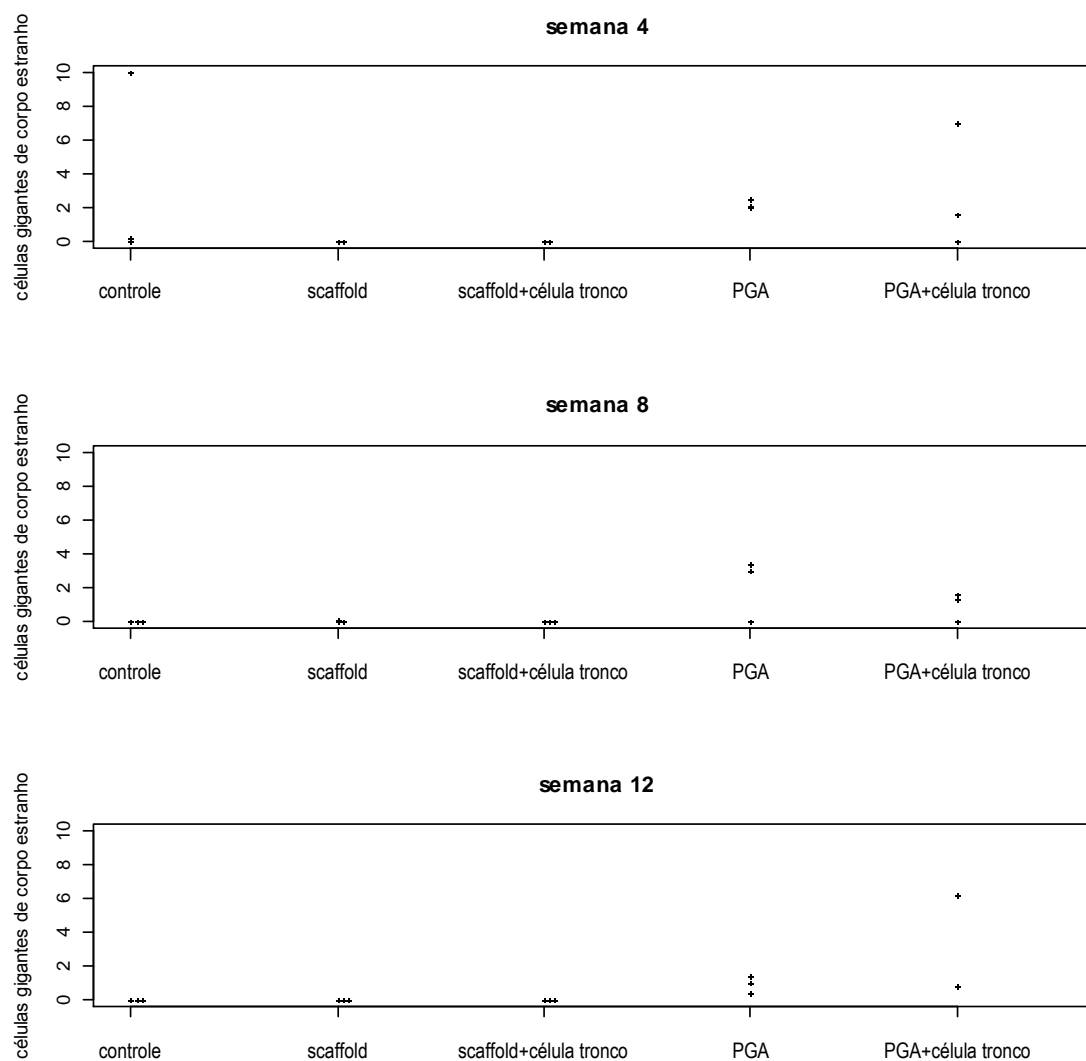
Anexo 3. Diagrama de dispersão unidimensional dos linfócitos dos animais, segundo semana e grupo.



Anexo 4. Diagrama de dispersão unidimensional dos macrófagos dos animais, segundo semana e grupo.



Anexo 5. Diagrama de dispersão unidimensional das células gigantes de corpo estranho dos animais, segundo semana e grupo.

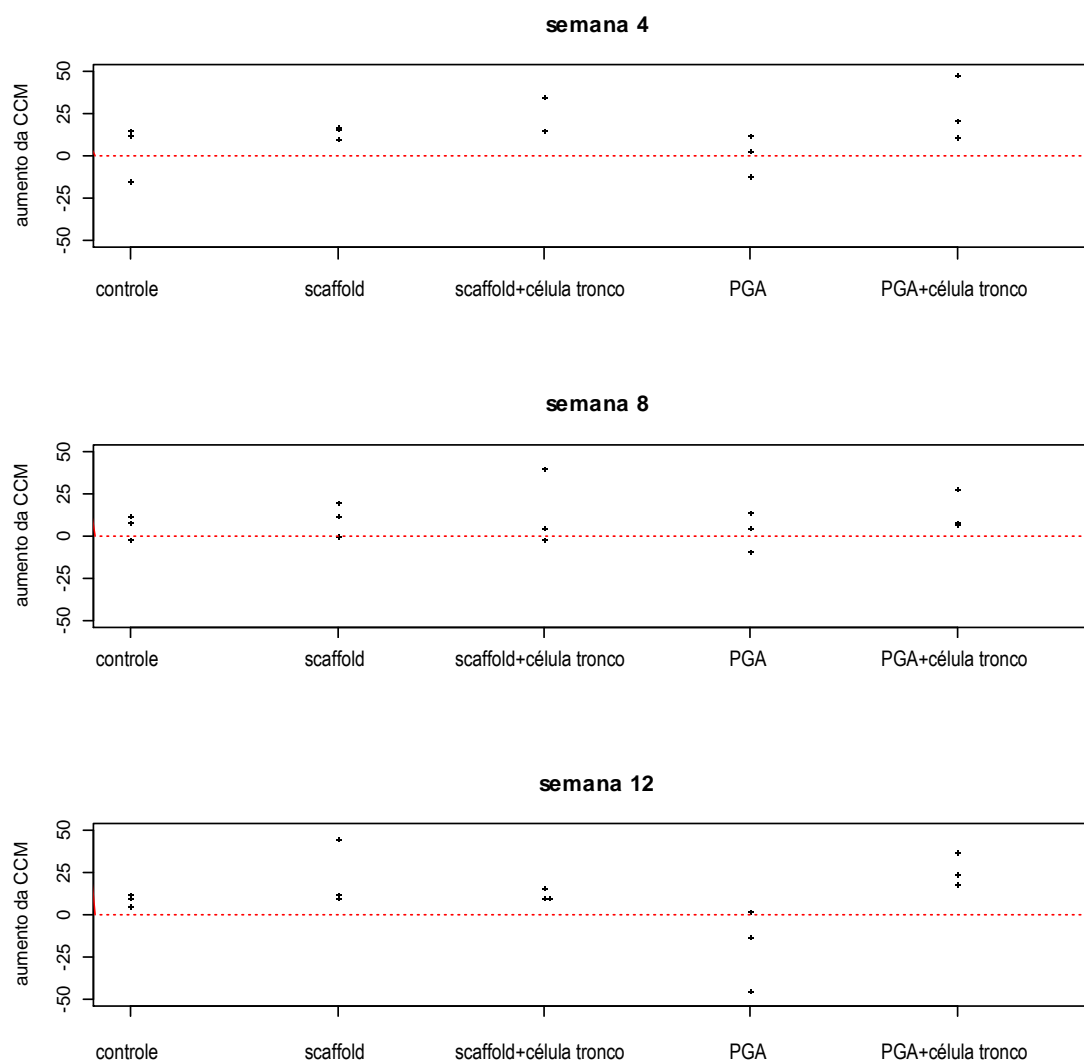


Anexo 6. Resultados inferenciais (valores de p) do teste de Kruskal-Wallis na comparação histológica e funcional entre os grupos, independente da semana.

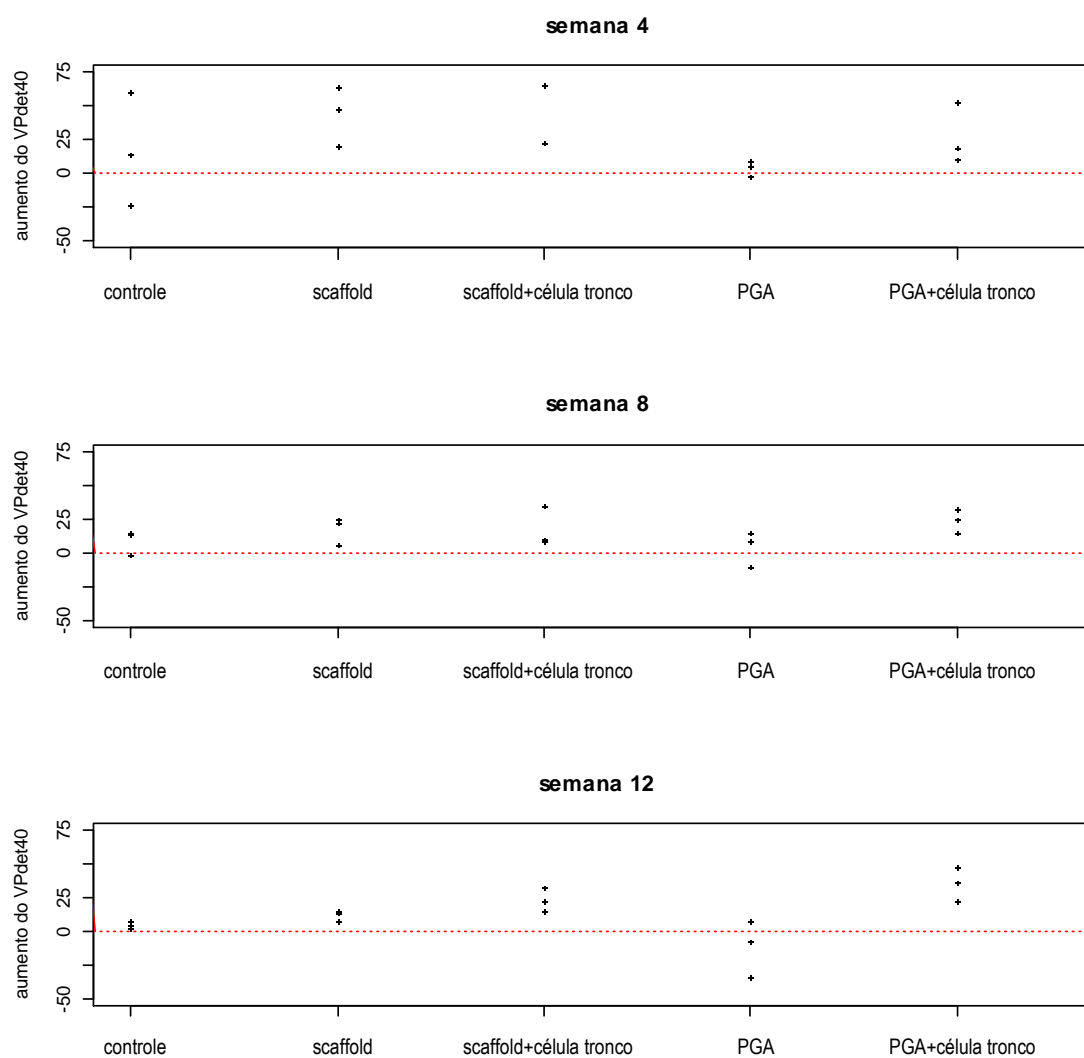
	Scaffold+			PGA+	
	Controle	Scaffold	Célula tronco	PGA	Célula tronco
Polimorfonucleares	0,148	0,670	0,405	0,061	0,236
Linfócitos	0,301	0,875	0,260	0,113	0,196
Macrófagos	0,430	0,252	0,062	0,491	0,286
Células gigantes de corpo estranho	0,105	0,558	>0,999	0,301	0,752
Capacidade cistométrica máxima pré	0,836	0,863	0,544	0,337	0,556
Capacidade cistométrica máxima pós	0,925	0,733	0,731	0,288	0,285
Aumento da capacidade cistométrica máxima	0,832	0,924	0,570	0,177	0,430
CCM* pré	0,739	0,561	0,260	0,561	0,505
CCM* pós	0,957	0,252	0,742	0,733	0,393
Aumento da VPdet40 *	0,707	0,148	0,423	0,430	0,587

* volume onde é atingido a pressão detrusora de 40 cm H₂O

Anexo 7. Diagrama de dispersão unidimensional do aumento da capacidade cistométrica máxima (CCM) dos animais, segundo semana e grupo.



Anexo 8. Diagrama de dispersão unidimensional do aumento do volume vesical na pressão detrusora de 40 cmH₂O (VPdet40) dos animais, segundo semana e grupo.



Anexo 9. Medidas-resumo da capacidade cistométrica máxima (CCM) dos animais, segundo semana, grupo e momento de tempo

Semana	Grupo		N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
4	controle	pré	3	44,00	50,00	19,00	63,00	22,61
		pós	3	48,00	48,00	31,00	65,00	17,00
		aumento	3	4,00	12,00	-15,00	15,00	16,52
	scaffold	pré	3	34,00	28,00	22,00	52,00	15,87
		pós	3	48,33	45,00	38,00	62,00	12,34
		aumento	3	14,33	16,00	10,00	17,00	3,79
	scaffold+célula tronco	pré	2	35,00	35,00	25,00	45,00	14,14
		pós	2	60,00	60,00	40,00	80,00	28,28
		aumento	2	25,00	25,00	15,00	35,00	14,14
	PGA	pré	3	23,00	18,00	11,00	40,00	15,13
		pós	3	24,00	23,00	21,00	28,00	3,61
		aumento	3	1,00	3,00	-12,00	12,00	12,12
	PGA+célula tronco	pré	3	23,33	24,00	19,00	27,00	4,04
		pós	3	50,00	48,00	35,00	67,00	16,09
		aumento	3	26,67	21,00	11,00	48,00	19,14
8	controle	pré	3	38,00	31,00	31,00	52,00	12,12
		pós	3	44,00	43,00	39,00	50,00	5,57
		aumento	3	6,00	8,00	-2,00	12,00	7,21
	scaffold	pré	3	32,67	30,00	20,00	48,00	14,19
		pós	3	43,33	40,00	30,00	60,00	15,28
		aumento	3	10,67	12,00	0,00	20,00	10,07
	scaffold+célula tronco	pré	3	47,00	40,00	25,00	76,00	26,21
		pós	3	61,33	74,00	30,00	80,00	27,30
		aumento	3	14,33	5,00	-2,00	40,00	22,50
	PGA	pré	3	36,33	40,00	21,00	48,00	13,87
		pós	3	39,67	39,00	35,00	45,00	5,03
		aumento	3	3,33	5,00	-9,00	14,00	11,59
	PGA+célula tronco	pré	3	28,00	27,00	24,00	33,00	4,58
		pós	3	42,33	35,00	31,00	61,00	16,29
		aumento	3	14,33	8,00	7,00	28,00	11,85
12	controle	pré	3	36,33	35,00	34,00	40,00	3,21
		pós	3	45,33	46,00	40,00	50,00	5,03
		aumento	3	9,00	10,00	5,00	12,00	3,61
	scaffold	pré	3	35,67	30,00	22,00	55,00	17,21
		pós	3	58,00	42,00	32,00	100,00	36,72
		aumento	3	22,33	12,00	10,00	45,00	19,66
	scaffold+célula tronco	pré	3	29,67	30,00	24,00	35,00	5,51
		pós	3	41,67	40,00	40,00	45,00	2,89
		aumento	3	12,00	10,00	10,00	16,00	3,46
	PGA	pré	3	54,67	53,00	15,00	96,00	40,53
		pós	3	36,00	40,00	17,00	51,00	17,35
		aumento	3	-18,67	-13,00	-45,00	2,00	24,01
	PGA+célula tronco	pré	3	35,67	43,00	18,00	46,00	15,37
		pós	3	62,00	61,00	55,00	70,00	7,55
		aumento	3	26,33	24,00	18,00	37,00	9,71

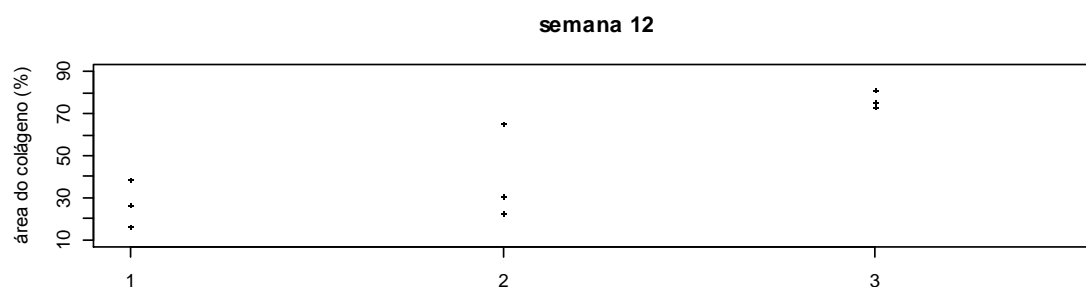
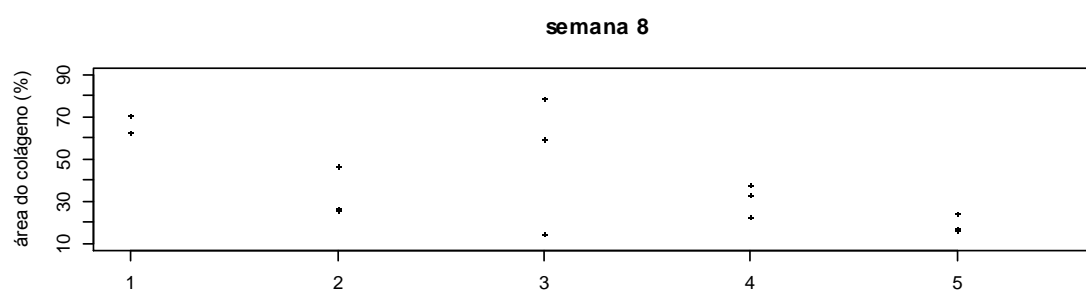
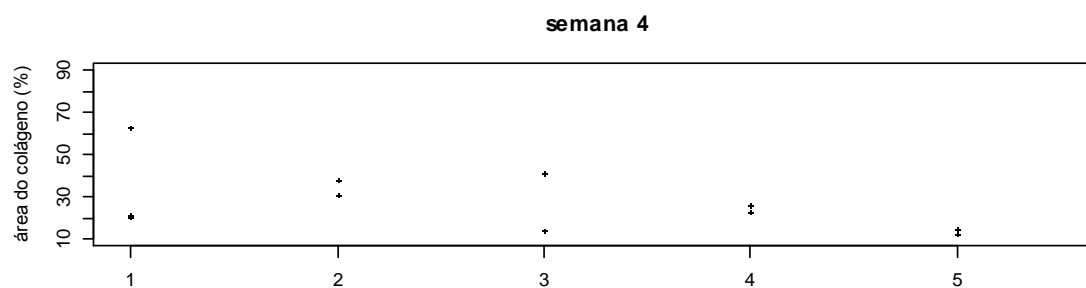
Anexo 10. Medidas-resumo do VPdet40, dos animais, segundo semana, grupo e momento de tempo.

Semana	Grupo		N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
4	controle	pré	3	65,00	83,00	27,00	85,00	32,92
		pós	3	82,00	60,00	41,00	145,00	55,38
		aumento	3	17,00	14,00	-23,00	60,00	41,58
	scaffold	pré	3	39,33	35,00	26,00	57,00	15,95
		pós	3	83,67	83,00	78,00	90,00	6,03
		aumento	3	44,33	48,00	21,00	64,00	21,73
	scaffold+célula tronco	pré	2	45,00	45,00	35,00	55,00	14,14
		pós	2	89,00	89,00	58,00	120,00	43,84
		aumento	2	44,00	44,00	23,00	65,00	29,70
	PGA	pré	3	37,00	29,00	24,00	58,00	18,36
		pós	3	41,00	34,00	33,00	56,00	13,00
		aumento	3	4,00	5,00	-2,00	9,00	5,57
	PGA+célula tronco	pré	3	53,33	51,00	46,00	63,00	8,74
		pós	3	81,00	82,00	57,00	104,00	23,52
		aumento	3	27,67	19,00	11,00	53,00	22,30
8	controle	pré	3	54,67	56,00	42,00	66,00	12,06
		pós	3	63,00	64,00	55,00	70,00	7,55
		aumento	3	8,33	13,00	-2,00	14,00	8,96
	scaffold	pré	3	40,33	42,00	27,00	52,00	12,58
		pós	3	57,67	51,00	48,00	74,00	14,22
		aumento	3	17,33	22,00	6,00	24,00	9,87
	scaffold+célula tronco	pré	3	72,67	65,00	42,00	111,00	35,13
		pós	3	90,00	100,00	50,00	120,00	36,06
		aumento	3	17,33	9,00	8,00	35,00	15,31
	PGA	pré	3	54,00	62,00	28,00	72,00	23,07
		pós	3	57,67	51,00	42,00	80,00	19,86
		aumento	3	3,67	8,00	-11,00	14,00	13,05
	PGA+célula tronco	pré	3	41,33	37,00	36,00	51,00	8,39
		pós	3	65,00	60,00	52,00	83,00	16,09
		aumento	3	23,67	24,00	15,00	32,00	8,50
12	controle	pré	3	57,00	56,00	55,00	60,00	2,65
		pós	3	61,67	63,00	57,00	65,00	4,16
		aumento	3	4,67	5,00	2,00	7,00	2,52
	scaffold	pré	3	75,67	45,00	38,00	144,00	59,28
		pós	3	87,67	60,00	45,00	158,00	61,37
		aumento	3	12,00	14,00	7,00	15,00	4,36
	scaffold+célula tronco	pré	3	42,33	40,00	37,00	50,00	6,81
		pós	3	65,67	60,00	55,00	82,00	14,36
		aumento	3	23,33	23,00	15,00	32,00	8,50
	PGA	pré	3	66,67	61,00	22,00	117,00	47,75
		pós	3	55,00	53,00	29,00	83,00	27,06
		aumento	3	-11,67	-8,00	-34,00	7,00	20,74
	PGA+célula tronco	pré	3	52,33	61,00	30,00	66,00	19,50
		pós	3	87,33	88,00	77,00	97,00	10,02
		aumento	3	35,00	36,00	22,00	47,00	12,53

Anexo 11. Resultados inferenciais (valores de p) do teste de Wilcoxon na comparação entre os momentos pré e pós da CCM e do VPdet40, segundo grupo e semana.

Grupo	Semana	CCM	VPdet40
Controle	4	0,785	0,593
	8	0,285	0,285
	12	0,109	0,109
Scaffold	4	0,109	0,109
	8	0,180	0,109
	12	0,109	0,109
Scaffold+célula tronco	4	0,180	0,180
	8	0,285	0,109
	12	0,102	0,109
PGA	4	0,785	0,285
	8	0,593	0,593
	12	0,285	0,285
PGA+célula tronco	4	0,109	0,109
	8	0,109	0,109
	12	0,109	0,109

Anexo 12. Diagrama de dispersão unidimensional área do colágeno (%) dos animais, segundo semana e grupo, sendo grupo 1 controle, grupo 2 scaffold de matriz, grupo 3 scaffold de matriz associado a célula tronco, grupo 4 PGA e grupo 5 PGA com célula tronco.



8 REFERÊNCIAS

1. Zambon JP, de Sa Barretto LS, Nakamura AN, et al. Histological changes induced by Polyglycolic-Acid (PGA) scaffolds seeded with autologous adipose or muscle-derived stem cells when implanted on rabbit bladder. *Organogenesis*. 2014;10(2):278-288. doi:10.4161/org.29058.
2. Campos Da Paz A , Beraldo PSS, Almeida MCRR, Neves EGC, Alaves CMF, Khan P. Traumatic injury to the spinal cord. Prevalence in Brazilian Hospitals. *Paraplegia*, 1992;30:636-40.
3. Stohrer M, Blok B, Castro-Diaz D, Chartier-Kastler E, del Popolo G, Kramer G, Pannek J, Radziszewski P, Wyndaele JJ. EAU guidelines on neurogenic lower urinary tract dysfunction. *Eur. Urol.* 2009;56:81-88. doi: 10.1016/j.eururo.2009.04.028. [PubMed] [Cross Ref]
4. McGuire EJ, Woodside JR and Borden T A. Upper urinary tract deterioration in patients with myelodysplasia and detrusor hypertonia: a follow-up study. *J. Urol.* 1983;129:823.
5. Traini C, Del Popolo G, Faussone-Pellegrini MS, Guasti D, Catarinicchia S, Vannucchi MG. Nerve sprouting and neurogenic inflammation characterize the neurogenic detrusor overactive bladder of patients no longer responsive to drug therapies. *J Cell Mol Med.* 2019;23(6):4076-4087. doi: 10.1111/jcmm.14294. Epub 2019 Apr 3.
6. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006;367:1241-6. PMID:16631879;http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68438-9
7. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology*. 2003;61:37-49.
8. Milsom I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thüroff J, Wein AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int.* 2001;87:760-6. Erratum in: *BJU Int* 2001;88:807.
9. von Mikulicz J. Classic articles in colonic and rectal surgery. Johann von Mikulicz-Radecki 1850-1905. *Dis Colon Rectum.* 1980 Oct;23(7):513-21.

10. Chapple CR, Khullar V, Gabriel Z, Muston D, Bitoun CE, Weinstein D. The effects of antimuscarinic treatments in overactive bladder: an update of a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol*. 2008;54:543-62.
11. Gilbert SM, Hensle TW. Metabolic consequences and long-term complications of enterocystoplasty in children: a review. *J Urol* 2005;173:1080-63.
12. Robson WA, Neal DE. Clinical outcome and quality of life following enterocystoplasty for idiopathic detrusor instability and neurogenic bladder dysfunction. *Br J Urol* 1995;76:551-7.
13. Kikuno N, Kawamoto K, Hirata H, Vejdani K, Kawakami K, Fandel T, Nunes L, Urakami S, Shiina H, Igawa M, Tanagho E and Dahiya R. Nerve growth factor combined with vascular endothelial growth factor enhances regeneration of bladder acellular matrix graft in spinal cord injury-induced neurogenic rat bladder. *BJU Int*. 2009;103(10):1424-8. doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.08129.x. Epub 2008 Oct 14.
14. Atala A. Engineering tissues, organs and cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(2):83-96. doi:10.1002/term.18 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
15. Kropp BP, Cheng EY, Lin HK, et al. Reliable and reproducible bladder regeneration using unseeded distal small intestinal submucosa. *J Urol* 2004;172:1710–3.
16. Bakhtiari J, Fattahian HR, Gharagozlou MJ, et al. Determination of the time required for appropriate chemical de-epithelialization of an ileal segment for cystoplasty: an animal model. *BJU Int* 2005;95:857–61.
17. Landman J, Olweny E, Sundaram CP, et al. Laparoscopic mid sagittal hemi-cystectomy and bladder reconstruction with small intestinal submucosa and reimplantation of ureter into small intestinal submucosa: 1-year followup. *J Urol* 2004;171:2450–5.
18. Baharvand H, Hashemi SM, Ashtiani SK, Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol*. 2004;50(7):645–652. doi:10.1387/ijdb.052072hb [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

19. Salcido-Ochoa F, Swee-Shan Hue S, Peng S, Fan Z, Lixiang Li R, Iqbal J, Allen Jr JC and Loh AHL. Histopathological analysis of infiltrating T cell subsets in acute T cell-mediated rejection in the kidney transplant. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved. World J Transplant. 2017;7(4):222-234 Published online Aug 24, 2017. doi: 10.5500/wjt.v7.i4.222
20. González-Molina M, Ruiz-Esteban P, Caballero A, Burgos D, Cabello M, Leon M, Fuentes L, Hernandez D. Immune response and histology of humoral rejection in kidney transplantation. Nefrologia. 2016 Jul-Aug;36(4):354-67. doi: 10.1016/j.nefro.2016.03.023. Epub 2016 Jun 3.
21. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. Tissue Eng. 2006;12(11):3007-3019. doi:10.1089/ten.2006.12.3007 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
22. Barretto LSS, Lessio C, Sawaki NA & Nakamura, Lo Turco EG, Silva CG, Zambon JP, Gozzo FC, Pilau EJ, Almeida FG. Cell kinetics, DNA integrity, differentiation, and lipid fingerprinting analysis of rabbit adipose-derived stem cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal 50(9) • June 2014. DOI: 10.1007/s11626-014-9782-x •
23. Nakamura ANS. Desenvolvimento de uma matriz acelular derivada de bexiga urinária. 2013.69p. Tese de Doutorado em Ciências - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, departamento de cirurgia, 2013
24. Skaff Junior M, Silveira Pinto E, Zambom JP, Gonçalves-Almeida F. Development of rabbits stress urinary incontinence animal model with anatomical-functional evaluation of urethral sphincter deficiency. International Braz J Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology 2012;38(1):17-24.
25. Becker AJ, Mcculloch EA & Till JL. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow cells. Nature 1963;197:452-454.
26. Lavik E, Langer R. Tissue engineering: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;65(1):1–8. doi:10.1007/s00253-004-1580-z [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

27. Kim M, Martin ST, Townsend KR, Gabardi S. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options. *Pharmacotherapy*. 2014;34(7):733-44. doi: 10.1002/phar.1426. Epub 2014 Apr 19.
28. Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, Van Der Woude FJ. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:2135-2141.
29. Filmer RB, Spencer JR. Malignancies in bladder augmentations and intestinal conduits. *J Urol*. 1990;143:671-8.
30. Pickard R. Tumour formation within intestinal segments transposed to the urinary tract. *World J Urol*. 2004;22:227-34.
31. Mao AS, Mooney DJ. Regenerative medicine: current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(47):14452-14459.
32. Ravi M, Paramesh V, Kaviya S, Anuradha E, Solomon F. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16-26. doi:10.1002/jcp.24683 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
33. Sloff M, Simaioforidis V, Vries R, Oosterwijk E and Feitz W. Tissue Engineering of the Bladder: Reality or Myth? A Systematic Review
34. Santucci RA, Barber TD. Resorbable extracellular matrix grafts in urologic reconstruction. *Int Braz J Urol* 2005;31:192-203.
35. DuRaine GD, Brown WE, Hu JC, Athanasiou KA. Emergence of scaffold-free approaches for tissue engineering musculoskeletal cartilages. *Ann Biomed Eng*. 2015;43(3):543-554. [PMC free article][PubMed] [Google Scholar]
36. Syed-Picard FN, Du Y, Hertsenbergh AJ, et al. Scaffold-free tissue engineering of functional corneal stromal tissue. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(1):59-69. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
37. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 2006;3(10):589-601. Epub 2006/09/15.

38. Mildmay-White A, Khan W. Cell Surface Markers on Adipose-Derived Stem Cells: A Systematic Review. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12(6):484-492. doi: 10.2174/1574888X11666160429122133.
39. Adams AB, Williams MA, Jones TR, et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest*. 2003;111(12):1887.
40. Dahms SE, Piechota HJ, Dahiya R, Lue TF, Tanagho EA. Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. *Br J Urol*. 1998;82(3):411-419.
41. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 1993;44:411-22.
42. Choo MS, Piao S, Oh SJ. The preventive effect of a free radical scavenger on oxidative stress after the relief of partial bladder outlet obstruction in a rat model. *PLoS One*. 2018 Oct 22;13(10):e0199800. doi: 10.1371/journal.pone.0199800. eCollection 2018.
43. Stoumpos S, Jardine AG, Mark PB. Cardiovascular morbidity and mortality after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2015;28:10- 21.
44. Aponte MM and Rosenblum N. Repair of Pelvic Organ Prolapse: What is the Goal? Department of Urology, New York University Langone Medical Center, New York, New York *Curr Urol Rep* 2014;15:385.
45. Voltarelli JC, Stracieri ABPL. Aspectos imunológicos dos transplantes de células tronco-hematopoéticas. *Medicina, Ribeirão Preto*, 2000;33:443-62.